Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Evaluation von kovalent bindenden FLT3- und Proteasom-Inhibitoren.

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT

vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von

Dennis Bensinger, M.Sc.
aus Darmstadt

Erstgutachter: Prof. Dr. Boris Schmidt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Katja Schmitz
Prof. Dr. Daniel Rauh

Darmstadt 2019

Bensinger, Dennis: Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Evaluation von kovalent bindenden FLT3- und Proteasom-Inhibitoren.

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2019

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2019

I can't accept not trying.

Michael Jordan

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Boris Schmidt in der Zeit von Juni 2014 bis Dezember 2018 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Boris Schmidt* für die Betreuung dieser Arbeit, sein spürbares Vertrauen in mich sowie die stete Unterstützung und die wissenschaftlichen Freiheiten, die ich während meiner Dissertation genoss.

Ich danke *Katja Schmitz* für die Übernahme des Korreferats und die Möglichkeit, die biochemischen Experimente dieser Arbeit in ihren Laboren durchzuführen.

Daniel danke ich für die großartige Zeit in D404. Ohne unser Teamwork, fortwährende Motivation und gegenseitige Inspiration wäre meine Diss nicht halb so gut geworden; ohne unsere Fußball-Samstage im Labor, Spieleabende, Feierabend-Biere, Kaffee-Meetings, Handwerker-Ausflüge und Grillabende nur halb so schön.

Johanna und *Theresa* danke ich für ihre vertrauensvolle Art, außerordentliche Hilfsbereitschaft und fachlichen Rat genauso wie für Unterstützung und Freundschaft, und dass ich mich auf jeden Tag mit euch im Labor freuen konnte.

Steffi und *Vicky* danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und noch viel mehr für ihre immer frohe, positive und offene Art, an die ich immer mit einem Lächeln zurückdenken werde.

Ich danke den aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises, *Anton*, *Binia*, Christoph, *Constantin*, *Eva*, *Georg*, *Johannes*, *Parul* und *Stefan* für das gute Arbeitsklima und schöne Zeiten auch außerhalb des Labors.

Ich danke allen Studenten, die mich während meiner Promotion begleitet haben und von denen ich lernen konnte und Erfahrungen gewinnen durfte: *JP*, *Marie*, *Nessy*, *Nicolas*, *Simon*, *Sebastian*, *Simone*, *Felix*, *Sissy*, *Joanna*, *Christian*, *Janika*, *Sascha*, *Laura*, *Marian*, *Alvaro* und *Philipp*.

Ich danke *Anke Imrich*, *Barbara Gantt*, *Stefanie Müller*, *Birgit Keenan*, *Christiane Rudolph*, *Gül Sahinalp*, *Alexander Schießer, Jochen Kühl, Tobias Meckel* und *Jürgen Ühlken* für wertvolle technische und administrative Unterstützung.

Ich danke *Anjali Cremer*, *Kay Hamacher*, *Peter-Michael Klötzel* und *Kimberly Stegmaier* für die unkomplizierten und erfolgreichen Kooperationen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für einfach alles. Ohne euer tiefes Vertrauen, eure Unterstützung, stete Verlässlichkeit, willkommene Ablenkung und Bestärkung wären mein Studium und meine Promotion undenkbar gewesen.

Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen vorgestellt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Elastase-like Activity Is Dominant to Chymotrypsin-like Activity in 20S Proteasome's β5 Catalytic Subunit

Dennis Bensinger,[#] Theresa Neumann,[#] Christoph Scholz, Constantin Voss, Sabine Knorr, Ulrike Kuckelkorn, Kay Hamacher, Peter-Michael Kloetzel, und Boris Schmidt

ACS Chemical Biology **2016** *11* (7), 1800-1804; DOI: 10.1021/acschembio.6b00023

Computer-Guided Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Quinoxalinebisarylureas as FLT3 Inhibitors

Stefan Göring, [#] Dennis Bensinger,[#] Eva Naumann und Boris Schmidt

ChemMedChem **2015** *10* (3), 511 – 522; DOI: doi.org/10.1002/cmdc.201402477.

Virtual Screening Identifies Irreversible FMS-like Tyrosine Kinase 3 Inhibitors with Activity towards Resistance-conferring Mutations

Dennis Bensinger, Daniel Stubba, Anjali Cremer, Vanessa Kohl, Theresa Waßmer, Johanna Stuckert, Victoria Engemann, Kimberly Stegmaier, Katja Schmitz und Boris Schmidt

*Im November **2018** eingereicht bei Journal of Medicinal Chemistry, under Revision.*

Cell-based optimization of covalent reversible ketoamide inhibitors bridging the unprimed to the primed site of proteasome´s β5 subunit

Daniel Stubba, [#] Dennis Bensinger,[#] Janika Steinbacher, Lilia Proskurjakov, Álvaro Salcedo Gómez, Stefan Roth, Katja Schmitz und Boris Schmidt

*Wird voraussichtlich im Januar **2019** eingereicht bei Journal of Medicinal Chemistry.*

[#] *- Diese Autoren haben zu gleichem Anteil zur Veröffentlichung beigetragen.*

Vorträge

- Dennis Bensinger, „Elastase-like Activity Is Dominant to Chymotrypsin-like Activity in 20S Proteasome's β5 Catalytic Subunit.", International PhD Students/Postdoc Meeting der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt, 29. – 31. März **2017**.

- Dennis Bensinger, „Elastase-like Activity Is Dominant to Chymotrypsin-like Activity in 20S Proteasome's β5 Catalytic Subunit.", International Young Scientists' Forum of Proteases in Diseases, Universitätsmedizin Mainz, Mainz, 7. Oktober **2016**.

Posterbeiträge

- Dennis Bensinger, Daniel Stubba, Theresa Neumann, Christoph Scholz, Johanna Stuckert, Victoria Engemann, Katja Schmitz and Boris Schmidt, „Discovery of Irreversible FLT3-Inhibitors with Activity in Acute Myeloid Leukemia Cell lines by Virtual Screening", Advances in Chemical Biology, Frankfurt, 30. & 31. Januar **2018**.

- Dennis Bensinger, Daniel Stubba, Theresa Neumann, Christoph Scholz, Constantin Voss, Sabine Knorr, Ulrike Kuckelkorn, Kay Hamacher, Peter-Michael Kloetzel and Boris Schmidt, „Elastase-like Activity Is Dominant to Chymotrypsin-like Activity in 20S Proteasome's β5 Catalytic Subunit.", Drug Innovation in Academia, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, 8. & 9. Dezember **2016**.

- Dennis Bensinger, Daniel Stubba, Theresa Neumann, Christoph Scholz, Constantin Voss, Sabine Knorr, Ulrike Kuckelkorn, Kay Hamacher, Peter-Michael Kloetzel and Boris Schmidt, „Elastase-like Activity Is Dominant to Chymotrypsin-like Activity in 20S Proteasome's β5 Catalytic Subunit.", Doktorandentag des Fachbereichs Chemie, Technische Universität Darmstadt, 28. Januar **2016**.

- Dennis Bensinger, Stefan Göring and Boris Schmidt, „Revival of an ancient tyrphostine scaffold: Computer-guided design, synthesis and biological evaluation of quinoxalinebisarylureas as FLT3 inhibitors.", Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt am Main, 24. – 26. September **2014**.

Danksagung ..... **v**

Veröffentlichungen ..... **vi**

Inhaltsverzeichnis ..... **viii**

Abkürzungsverzeichnis ..... **xvii**

Liste der Aminosäuren ..... **xx**

1. Einleitung **1**

1.1 Leukämie 1

1.1.1 Symptome der Leukämie 3

1.1.2 Risikofaktoren zur Entwicklung von Leukämien 4

1.1.3 Diagnose und Klassifizierung der AML 5

1.1.4 Inzidenz und Überleben bei AML 7

1.1.5 Therapie der AML 8

1.1.6 Stammzelltransplantation zur Behandlung der AML 11

1.1.7 Entwicklung neuer Therapien für die AML 12

1.2 Kinasen als Zielproteine in der Wirkstoffentwicklung 16

1.2.1 Funktion und Klassifizierung von Proteinkinasen 16

1.2.2 Struktur von Proteinkinasen 18

1.2.3 Inhibition von Protein-Kinasen 21

1.2.4 Klinisch zugelassene Kinase-Inhibitoren 22

1.3 Kovalent bindende Inhibitoren 24

1.3.1 Entwicklung von kovalent-bindenden Kinase-Inhibitoren 26

1.3.2 Elektrophile Gruppen für die Entwicklung kovalenter Inhibitoren 27

1.3.3 Therapeutisch zugelassene kovalent bindende Kinase-Inhibitoren 28

1.4 Inhibition von FLT3 zur Therapie der AML 29

1.4.1 Aufbau und Regulation der FLT3 29

1.4.2 FLT3 als Proto-Onkogen 30

1.4.3 Übersicht der FLT3 Kinase-Inhibitoren in klinischer Entwicklung 31

1.4.4 Irreversible FLT3-Inhibitoren 36
1.4.5 Aufkommen von Therapie-resistenten FLT3-Mutationen 37
1.5 Das Proteasom als Zielprotein in der Tumortherapie 39
1.5.1 Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren 41
1.6 Molekulare Modellierung von kovalent bindenden Inhibitoren 49
2. Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit 51
Rationales Design von kovalent bindenden FLT3- und Proteasom-Inhibitoren 51
Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Charakterisierung von irreversiblen FLT3-Inhibitoren 51
Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Charakterisierung von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren 52
Rationales Design möglicher zukünftiger Inhibitoren 52
3. Ergebnisse und Diskussion 53
3.1 Strukturbasierte Entwicklung und Charakterisierung von irreversibel bindenden FLT3-Inhibitoren 53
3.1.1 Entwicklung eines FLT3-Homologiemodells in der aktiven Konformation 53
3.1.2 Analyse der Bindungsmodi bekannter FLT3-Inhibitoren in der aktiven Konformation 56
3.1.3 Synthese und Evaluierung der reversiblen Inhibitoren 64
3.1.4 Synthese und biochemische Evaluierung von Indolinon-Derivaten 68
3.1.5 Biochemische Evaluierung von Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren 75
3.1.6 Analyse der Vorhersagekraft 77
3.1.7 Optimierung der Screening-Treffer BSc5234 und BSc5237 78
3.1.7.1 Strukturbasiertes Design 78
3.1.8 Synthese von elektrophilen Sunitinib-Hybridstrukturen 82
3.1.9 Pharmakologische Evaluierung der elektrophilen Sunitinib-Hybridstrukturen. 83
3.1.10 Untersuchung der Protein-Expression und Phosphorylierung mittels Western-Blots 85
3.1.11 Bestimmung der Selektivität gegenüber verschiedenen Kinasen 86

3.1.12 Zeit- und ATP-abhängige Inhibition von FLT3 90

3.1.13 Trypsin-Verdau und MALDI-MS-Analyse der kovalent modifizierten FLT3-Kinase 92

3.1.14 Bestimmung der Halbwertszeit irreversibler FLT3-Inhibitoren gegenüber verschiedenen Nukleophilen..... 93

3.1.15 Inhibition von Therapie-resistenten Mutationen der FLT3-Kinase..... 94

3.1.16 Zeitabhängige Inhibition der MV4-11 Zellviabilität..... 96

3.1.17 Evaluierung irreversibler FLT3-Inhibitoren im *Danio rerio* Toxizitätsassay..... 98

3.1.18 Entwicklung irreversibel bindender, fluoreszenter FLT3-Inhibitoren..... 99

3.1.18.1 Strukturbasiertes Design 99

3.1.18.2 Synthese der BODIPY-konjugierten irreversiblen FLT3-Inhibitoren.... 100

3.1.18.3 Physikochemische und biochemische Evaluierung von BODIPY-konjugierten, irreversiblen FLT3-Inhibitoren 104

3.2 Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Charakterisierung von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren..... 111

3.2.1 Molekulare Modellierung des Einflusses von Met45 auf die Spezifität in der S1-Bindetasche 111

3.2.2 Entwicklung eines zellbasierten Assays zur Proteasom-Inhibition 114

3.2.3 Molekulare Modellierung von Ketoamid-basierten Inhibitoren 116

3.2.4 Pharmakologische Evaluierung der Proteasom-Inhibitoren 119

3.2.5 Entwicklung einer Strategie zum kovalenten *de novo* Docking von peptidischen Proteasom-Inhibitoren..... 129

3.2.6 Entwicklung eines *Danio rerio* Embryo Fluchtreflex-Assays..... 138

3.3 Modellierung neuer, kovalent bindender FLT3- und Proteasom-Inhibitoren . 143

3.3.1 Entwicklung einer Strategie zur kovalenten Modellierung von makrocyclischen Imidazo[1,2-a]pyridinen zur Inhibition von FLT3 143

3.3.2 Entwicklung einer virtuellen Screening-Strategie zur Entdeckung dual-kovalent bindender Proteasom-Inhibitoren..... 146

4. Zusammenfassung und Ausblick..... 150

4.1 Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Evaluierung von irreversiblen FLT3-Inhibitoren 150

4.2 Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Evaluierung von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren 156

5. Experimenteller Teil 160

5.1 Molekulare Modellierung 160

5.1.1 Entwicklung eines DFG-*in* Homologie Modells von FLT3 160

5.1.2 Strukturbasiertes Design von irreversiblen FLT3-Inhibitoren 161

5.1.2.1 Molekulares Docking von reversibel bindenden FLT3 Inhibitoren 161

5.1.2.2 Kovalentes Docking von irreversibel bindenden FLT3-Inhibitoren 161

Grundgerüst 1: N^2,N^4-Diphenylpyrimidin-2,4-diamin 163

Grundgerüst 2: *N*-(Pyridin-2-yl)-9*H*-pyrido[4',3':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2 164

Grundgerüst 3: *N*-(5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-2-(phenylthio)pyrimidin-4-amin 165

Grundgerüst 4: *N*,4-Diphenylpyrimidin-2-amin 166

Grundgerüst 5: 3,5-Diphenyl-1*H*-pyrrolo[2,3-b]pyridin 167

Grundgerüst 6: (*Z*)-3-((Phenyl)methylen)indolin-2-on 168

Grundgerüst 7: 3-Phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin 169

Grundgerüst 8: *N*-Phenylchinazolin-4-amin 170

Grundgerüst 9: *N*-(2-Oxo-5-(pyrimidin-4-yl)-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzamid 171

Grundgerüst 10: 3-(1*H*-Benzo[d]imidazol-2-yl)chinolin-2(1*H*)-on 172

Grundgerüst 11: 3-(4-Methylfuran-2-yl)-4-phenylchinolin-2(1*H*)-on 173

Grundgerüst 12: Di(1*H*-indol-2-yl)methanon 174

Grundgerüst 13: 6,7,12,13-Tetrahydro-5*H*-indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazol-5-on 175

5.1.2.3 Detaillierte Ergebnisse des virtuellen Screenings 176

5.1.3 Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren 179

5.1.3.1 Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren 179

5.1.3.2 Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren 179

5.2 Organische Synthese 184

5.2.1 Allgemeine Anmerkungen 184
5.2.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel 184
5.2.1.2 Säulen- und Dünnschichtchromatographie 184
5.2.1.3 NMR- und MS-Spektroskopie 184
5.2.1.4 HPLC-Analytik 185
5.2.1.5 Mikrowellen-gestützte Synthese 185
5.2.2 Synthese reversibler FLT3-Inhibitoren 186
5.2.2.1 Synthese von Imidazo[1,2-a]pyridin (BSc5221) 186
5.2.2.2 Synthese von (*Z*)-3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)indolin-2-on (BSc5229) 187
5.2.2.3 Synthese von (*Z*)-3-Benzylidenindolin-2-on (BSc5230) 188
5.2.3 Synthese von 5-substituierten Indolinon-Derivaten 189
5.2.3.1 Synthese von 5-Aminoindolin-2-on (1) 189
5.2.3.2 Synthese von 2,2,2-Trifluoro-*N*-(2-oxoindolin-5-yl)acetamid (2) 190
5.2.3.3 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid (3) 191
5.2.3.4 Synthese von (*Z*)-3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-5-aminoindolin-2-on (4) .. 192
5.2.3.5 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)acetamid (BSc5232) 193
5.2.3.6 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-propionamid (BSc5236) 194
5.2.3.7 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-ethanesulfonamid (BSc5235) 195
5.2.3.8 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-2-chloracetamide (BSc5237) 196
5.2.3.9 Synthese von (Z)-N-(3-((1H-pyrrol-2-yl)methylene)-2-oxoindolin-5-yl)-2-bromacetamid (BSc5316) 197
5.2.3.10 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-2-fluoracetamid (BSc5315) 198
5.2.3.11 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-acrylamid (BSc5233) 199

5.2.3.12 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-propionamid (BSc5238) 200

5.2.3.13 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)ethen-sulfonamid (BSc5234) 201

5.2.3.14 Synthese von 5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carbonsäure (5) ... 202

5.2.3.15 Synthese von *N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (6) 203

5.2.3.16 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrole-3-carboxamid (7) .. 204

5.2.3.17 Synthese von (*Z*)-5-((5-Amino-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethyl-amino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (8) 205

5.2.3.18 Synthese von (*Z*)-5-((5-Acetamido-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5319) 206

5.2.3.19 Synthese von (*Z*)-5-((5-(2-Chloracetamido)-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5318) 207

5.2.3.20 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(vinyl-sulfonamido)indolin-3-yliden)-methyl)-1H-pyrrol-3-carboxamid (BSc5371) . 208

5.2.3.21 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-5-((5-(ethylsulfonamido)-2-oxo-indolin-3-yliden)methyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5411) 209

5.2.3.22 Synthese von (*E*)-3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)acrylsäureethylester (11) 210

5.2.3.23 Synthese von 3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)propansäureethylester (12) 211

5.2.3.24 Synthese von 3,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd (14) 212

5.2.3.25 Synthese von 3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-5λ^4,6λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propansäureethylester (15) 213

5.2.3.26 Synthese von 3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-5λ^4,6λ^4-dipyrrol[1,2-c:2',1'-*f*]-[1,3,2]diazaborinin-3-yl)propansäure (16) 214

5.2.3.27 Synthese von 2-Bromessigsäureethylester (17) 215

5.2.3.28 Synthese von 2-(4-Formylphenoxy)essigsäurebenzylester (18) 216

5.2.3.29 Synthese von 2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)essigsäure-benzylester (19) 217

5.2.3.30 Synthese von 2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ4,5λ4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]-diazaborinin-10-yl)phenoxy)essigsäure (20) 218

5.2.3.31 Synthese von *tert*-Butyl-(2-(5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamido)ethyl)carbamat (21) 219

5.2.3.32 Synthese von *tert*-Butyl-(*Z*)-(2-(2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluor-acetamid)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamido)ethyl)carbamat (22) 220

5.2.3.33 Synthese von (Z)-N-(2-Aminoethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluor-acetamido)indolin-3-yliden)-methyl)-1*H*-pyrrole-3-carboxamide Hydrochlorid (23) 221

5.2.3.34 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (24) 222

5.2.3.35 Synthese von (*Z*)-5-((5-(Acetamido)-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(3-(5,5-difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamid (BSc5317) 224

5.2.3.36 Synthese von (*Z*)-5-((5-(2-Chloracetamido)-2-oxoindolin-3-yliden)-methyl)-*N*-(2-(3-(5,5-difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5320) 226

5.2.3.37 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy) acetamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoro-acetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5382) 228

5.2.3.38 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy) acetamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(vinylsulfon-amido)indolin-3-ylidene)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5381) 230

5.2.4 Bestimmung der Reinheit der getesteten Substanzen durch HPLC 232
5.3 Pharmakologische Charakterisierung irreversibler FLT3 Inhibitoren 233
5.3.1 Biochemische Methoden 233
5.3.1.1 Vorbereitung der verwendeten Inhibitoren 233
5.3.1.2 Zelllinien 233
5.3.1.3 Bestimmung der Zellviabilität 234
5.3.1.3.1 Fluoreszente Endpunkt-Bestimmung der Zellviabilität 234
5.3.1.3.2 Chemolumineszentes Endpunkt-Assay 235
5.3.1.3.3 Zeitabhängige Bestimmung der Zelltoxizität 235
5.3.1.4 Western Blot 236
5.3.1.5 In-Gel Trypsinierung von FLT3 und MALDI-MS/MS Analyse 236
5.3.1.6 Bestimmung der Inhibition der Kinaseaktivität 237
5.3.1.6.1 ADP Glo Assay 237
5.3.1.6.2 Bestimmung der Kinaseinhibition durch die Leitstruktur BSc5371 238
5.3.1.7 Durchführung des Zebrafisch-Embryonen Toxizitätsassays 238
5.3.1.8 Durchführung des Zebrafisch- Embryonen Fluchtreflexassays 240
5.3.1.9 Bestimmung der Halbwertszeit elektrophiler Inhibitoren 241
5.3.1.10 Nachweis der Fluoreszenz mit SDS-PAGE und Western Blot 241
5.3.1.11 Bestimmung der Inhibition von isoliertem Proteasom 242
5.3.1.12 Bestimmung der zellulären Inhibition des Proteasoms 242
5.3.2 Dosis-Wirkungskurven 244
5.3.2.1 Dosis-Wirkungskurven der Zellviabilität-Testungen 244
5.3.2.1.1 MV4-11 Zellen 244
5.3.2.2 Jurkat-Zellen 252
5.3.2.3 THP1-Zellen 254
5.3.2.4 256
5.3.2.5 Zeitabhängige Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von FLT3-Inhibitoren in MV4-11 Zellen 257

5.3.2.6 Dosis-Wirkungskurven der Bindung von BSc5371 an Therapie-resistente FLT3-Mutationen 258
5.3.2.7 Inhibition der zellulären Umsetzung des Proteasom-Substrats BSc5098 259
5.3.3 Charakterisierung fluoreszenter FLT3-Inhibitoren 262
5.3.4 Trypsin-Verdau von FLT3 nach Inkubation mit elektrophilen Molekülen 263
5.3.4.1 Inkubation mit 2-Iodacetamid 263
5.3.4.2 Inkubation mit BSc5234 264
5.3.4.3 Inkubation mit BSc5371 265
5.3.4.4 Inkubation mit Hypothemycin 266
5.3.4.5 Inkubation mit BSc5318 267
5.3.5 *Danio rerio* Embryo Toxizitätsassay 268
5.3.6 Z'-Faktoren des zellbasierten Proteasom-Assays 270
5.3.7 *Danio rerio* Embryo Fluchtreflex Assay 271
5.3.7.1 Aufbau des Experiments 271
5.3.7.2 Software zur Bestimmung der Bewegungsamplitude 272
5.3.7.3 Statistische Auswertung des Fluchtreflex-Assays 273
5.3.7.4 Darstellungen der Bewegungsamplitude der Embryonen 274
5.3.7.4.1 Kontrollgruppe 274
5.3.7.4.2 Behandlung mit BSc5376 (50 μM, 24 h) 274
5.3.7.4.3 Behandlung mit Bortezomib (25 μM, 24 h) 275
5.3.7.4.4 Behandlung mit Bortezomib (25 μM, 48 h) 275
5.3.7.4.5 Behandlung mit BSc5376 (25 μM, 24 h) 276
5.3.7.4.6 Behandlung mit Bortezomib (25 μM, 48 h) 276
5.3.7.5 Vergleich der kinematischen Parameter zwischen der Kontrolle und mit Wirkstoff behandelten Embryonen 277
Literaturverzeichnis 280
Anhang I

Abkürzungsverzeichnis

AC	Acrylamid
ara-C	Cytarabin
ADP	Adenosindiphosphat
Ambic	Ammoniumbicarbonat-Lösung
APL	Akute Promyelozytenleukämie
Äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	Tretinoin
BODIPY	Borondipyrromethen
BSA	Bovines Serumalbumin
BTZ	Bortezomib
cCP	Kernpartikel des konstitutiven Proteasoms
CD	*Cluster of differentiation*
CFZ	Carfilzomib
cKIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
CMML	Chronische Myelomonozytische Leukämie
CRG	Chemisch-reaktive Gruppe
d	Dublett
DCM	Dichlormethan
dG	freie Enthalpie (delta G)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpf	Tage nach Fertilisation
DSX	*Drug Score eXtended*
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
Em.	Emission
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol

Exc.	Exzitation
FLT3	FMS-ähnliche Tyrosinkinase 3
GK	*Gatekeeper*-Rest
GSH	Glutathion
GSK	Glykon Synthase Kinase
h	Stunden
HA	Haloacetamid
HATU	*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyluronium hexafluorphosphat
HDAC	Histondeacetylase
HG	Hydroxyglutarat
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hpf	Stunden nach Fertilisation
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
HY	Hypothemycin
Hz	Hertz
IAA	2-Iodacetamid
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IC_{50}	halb-maximale inhibitorische Konzentration
iCP	Kernpartikel des Immunoproteasoms
IDH	Isocitratdehydrogenase
ITD	Interne Tandemduplikation
J	Kopplungskonstante
JM	Juxtamembrandomäne
Lsg.	Lösung
m	multiplett
M	Mol pro Liter
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MBP	Myelobasisches Protein
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MeOH	Methanol
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MOE	Molecular Operating Environment
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
n.V.	nicht Verfügbar
nM	Nanomolar
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
PA	Propargylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrohorese
PCR	Polymaerase-Kettenreaktion
PDB	*Protein Data Bank*
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	Quartett
RMSD	mittlere Abweichung (*root mean square deviation*)
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TKL	Tyrosinkinase-ähnlich
TOF	Flugzeit (*time of light)*
t_R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
THF	Tetrahydrofuran
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VS	Vinylsulfonamid

Liste der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Trytophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

1.1 Leukämie

Das Wort „Leukämie“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Weißes Blut“. Es wurde erstmals 1847 durch Rudolf Virchow als solches beschrieben nachdem es bei einem Patienten beobachtet wurde.[1] Leukämien sind maligne Neoplasien des blutbildenden Systems. Sie entwickeln sich aus den Vorläuferzellen von funktionalen Zellen des Blutes und werden anhand ihres Ursprungs aus der myeloiden oder lymphatischen Vorläuferzelle unterschieden.[2] Diese entwickelt sich aus der hämatopoetischen Stammzelle, welche die Fähigkeit hat, sich selbst zu erneuern (Abbildung 1). Die Blutbildung, also die Hämatopoese, findet ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle über die Vorläuferzellen im Knochenmark statt. Diese kann sich in alle ausgereiften Zellarten des Blutes differenzieren. Thrombozyten entwickeln sich aus Megakaryozyten und sind zentral für die Blutgerinnung. Erythrozyten sind die häufigsten Blutzellen und enthalten Hämoglobin, das die Bindung von Sauerstoff und damit dessen Transport durch das Blut ermöglicht. Die Gruppe der Granulozyten besteht aus den neutrophilen, den basophilen und den eosinophilen Granulozyten und werden anhand ihres Färberverhaltens in der Histologie unterschieden. Monozyten werden ausgehend von Monoblasten gebildet und können in Makrophagen, die Phagozytose betreiben und als angeborenes Immunsystem wirken, oder dendritische Zellen, die Antigene für T-Zellen präsentieren, differenzieren. Lymphozyten (NK-Zellen, B-Zellen oder T-Zellen) sind ebenfalls weiße Blutzellen und bilden das adaptive Immunsystem.[3]

Leukämien werden anhand ihrer Entwicklungsgeschwindigkeit in eine chronische oder eine akute Krankheitsform unterschieden. Akute Leukämien gehen von nicht ausgereiften Vorläuferzellen, den sogenannten Blasten, aus und entwickeln sich rapide. Sie können ins Blut übergehen und in andere Organe metastasieren. Akute Leukämien führen unbehandelt schnell zum Tod.[4] Chronische Leukämien entwickeln sich ausgehend von ausgereiften, aber ebenfalls unnormalen Zellen. Die Entwicklung benötigt meist sehr lange.

Sind die Vorläuferzellen der Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten oder Granulozyten betroffen, handelt es sich um eine myeloide Leukämie. Sind Vorläuferzellen der Lymphozyten (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen), prä-T-Zellen oder

prä-B-Zellen betroffen, so handelt es sich um eine lymphatische bzw. lympho-blastische Leukämie.[5]

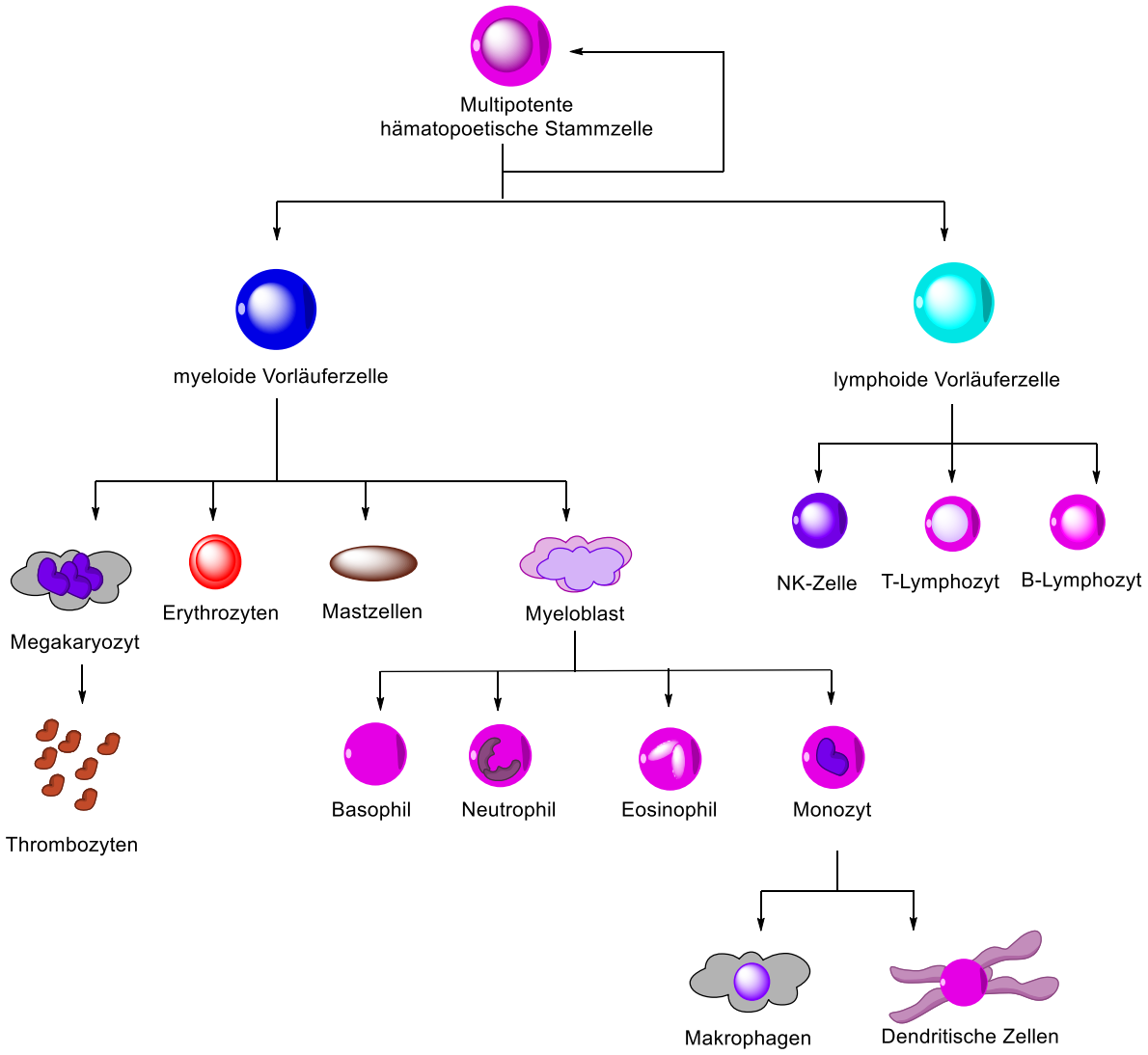


Abbildung 1. Schematische Abbildung der Hämatopoese ausgehend von der multipotenten, hämatopoetischen Stammzelle über die myeloide und die lymphoide Vorläuferzellen (in Anlehnung an Göttgens et al.).[6]

Somit können grundsätzlich folgende Arten von Leukämien unterschieden werden:

- Akute myeloische Leukämie (AML)
- Chronische myeloische Leukämie (CML)
- Akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Daneben existieren noch einige seltene Unterformen von Leukämien, wie die Haarzellleukämie[7] oder die adulte T-Zellleukämie.[8] Zudem gibt es noch prä-leukämische Formen wie das myelodysplastische Syndrom oder das transitorisch myeloproliferative Syndrom, die eine Vorstufe der Leukämie darstellen und sich zu dieser entwickeln können.[9] Neben der Leukämie werden auch Lymphome zu den hämatologischen Neoplasien gezählt. Lymphome sind maligne Neoplasien von lymphatischen Zellen und können in Hodgkin-Lymphome und die heterogene Gruppe der *Non*-Hodgkin-Lymphome unterteilt werden.[10]

1.1.1 Symptome der Leukämie

Die klinischen Symptome, die sich aus der Leukämie entwickeln, beruhen im Wesentlichen auf der Verdrängung der normalen Produktion von funktionalen Blutzellen durch leukämische Blasten.[11]

Der Mangel an Thrombozyten im Blut (Thrombozytopenie) führt zu intensiveren Blutungen, beispielsweise des Zahnfleischs, der Nase und Hämatomen, aber auch Kapillarblutungen der Haut.[12] Die geringere Bildung von Erythrozyten führt zur Anämie und Symptomen wie Müdigkeit, Blässe und Kurzatmigkeit.[13] Eine verringerte Bildung von funktionalen Leukozyten, die Leukopenie, schwächt die Abwehr des Körpers gegen Krankheitserreger und führt zu lebensbedrohlichen Infektionen, wie beispielsweise Lungenentzündungen.[14] Zusätzlich können auch unspezifische Symptome wie Fieber und Gewichtsverlust auftreten und eine Differenzialdiagnose erschweren. Durch Einlagerung von Blasten können verschiedene Organe wie die Leber oder die Milz, aber auch das Zahnfleisch vergrößert beziehungsweise geschwollen sein.[15]
Die Todesursache der Leukämien können Blutungen, entweder in der Lunge oder im Gehirn, oder Infektionen mit Pilzen, Viren oder Bakterien und Blutvergiftungen sein.[16]

1.1.2 Risikofaktoren zur Entwicklung von Leukämien

Der genaue Grund für die Entwicklung einer Leukämie ist unbekannt, wobei eine Kombination aus genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen als wahrscheinlich gilt. Risikofaktoren für die Entwicklung einer Leukämie sind schädliche Umweltfaktoren, wie beispielsweise Tabakrauch, verschiedene Chemikalien (Benzol,[17] Diesel[18]), eine vorhergehende Chemotherapie und ionisierende Strahlung.[19] Diese Einflüsse können alle zu einer Mutation der DNA führen. Dabei können entweder Onkogene durch Mutation entstehen, beziehungsweise aktiviert werden oder Tumorsuppresorgene desaktiviert werden, wodurch die Regulation von Apoptose, Zelldifferenzierung oder -teilung geändert wird.

Das radioaktive Isotop ^{89}Sr, das unter anderem zur Therapie des Prostatakarzinoms eingesetzt wird, und eine Reihe weiterer Isotope, die häufig in der Umgebung von Kernkraftwerken nachgewiesen werden können, stehen im Verdacht AML auszulösen.[20-21] Die adulte T-Zellleukämie stellt eine Besonderheit dar, da sie durch das humane T-lymphotrope Virus ausgelöst werden kann.[22] Es gibt außerdem einzelne Berichte, die eine Assoziation von akuten Leukämien im Kindesalter mit einer durch Fruchtbarkeitsbehandlung geförderte Schwangerschaft herstellen.[23]

Ein weiterer Risikofaktor für die AML stellt das Down-Syndrom dar.[24] Die transiente Leukämie entwickelt sich bei 5 – 10% aller Kindern mit Trisomie 21 und kann sich bereits während der Schwangerschaft entwickeln.[25] In 10% der Fälle entwickelt sich die Erkrankung weiter zu einer akuten megakaryoblastischen Leukämie.[26]

Die chronisch myeloische Leukämie zeigt als einzige Leukämie eine konservierte Mutation die ursächlicher Auslöser der Krankheit ist, das sogenannte Philadelphia-Chromosom.[27] Es liegt in 95% der Patienten vor und führt durch reziproke Translokation zwischen dem Chromosomen 9 und 22 zu dem Fusionsgen BCR-ABL1, das zu einer konstitutionell aktivierten Form der Abelson-Proteinkinase führt.[28] Die Bedeutung dieses Onkogens für die moderne Medizinalchemie im Allgemeinen und speziell für die Entwicklung von Kinase-Inhibitoren wird im späteren Verlauf dieser Arbeit ausgeführt. Insgesamt stellen die Leukämien, mit Ausnahme der CML, eine heterogene Gruppe an Erkrankungen dar, deren Ursache nicht bekannt ist.[29]

1.1.3 Diagnose und Klassifizierung der AML

Die AML wird typischerweise auf der Basis von Knochenmark-Aspiraten oder seltener auch aus dem peripheren Blut diagnostiziert. Insbesondere im frühen Krankheitsstadium kann das Blut jedoch *aleukämisch* sein, wenn sich die abnormen weißen Blutzellen nicht in das Blut ausgebreitet haben. Unter dem Mikroskop ist dann eine große Menge an unausgereiften, dysfunktionalen weißen Blutzellen zu beobachten. Ein Maß für den Fortschritt der Leukämie und den Behandlungserfolg ergibt sich anhand der Anzahl der weißen Blutzellen.[30]
Eine weitergehende zytogenetische Untersuchung prüft auf spezifische Mutationen wie von der FMS-ähnlichen Tyrosinkinase 3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*, FLT3, CD135), dem Nukleophosmin 1-Gen (NPM1) oder cKIT (CD117).[31] Eine hohe Zahl an weißen Blutzellen weist außerdem bei gleichzeitigem Vorliegen von Mutationen der FLT3 auf eine verringerte Überlebensrate hin.[32] Entscheidend ist eine Abgrenzung zu anderen Erkrankungen, wie beispielsweise der perniziösen Anämie[33], die auf einer Vitamin B12-Defizienz, beziehungsweise Folsäure-Defizienz beruht,[34] oder Kupfer-Mangelerscheinungen, die zu dem gleichen klinischen Erscheinungsbild mit veränderten Knochenmark-Strukturen führen können.
Die genaue Klassifizierung in verschiedene Unterformen der AML erlaubt die Auswahl der besten Behandlung und ermöglicht die Erstellung einer Prognose für den Patienten.

Zur Klassifizierung der AML gibt es zwei verschiedene Systeme. Das Französisch-Amerikanisch-Britische System (FAB) wurde in den 1970er Jahren entwickelt und teilt die AML anhand des Zelltyps und der Zellreife in die Gruppen M0 bis M7 ein.[35] Diese sind:

- M0: Undifferenzierte akute myeloblastische Leukämie
- M1: Akute myeloblastische Leukämie mit minimaler Reifung
- M2: Akute myeloblastische Leukämie mit Reifung
- M3: Akute promyelozytische Leukämie
- M4: Akute myelomonozytische Leukämie
- M4eos: Akute myelomonozytische Leukämie mit Eosinophilie

- M5: Akute monozytische Leukämie
- M6: Akute erythroide Leukämie
- M7: Akute megakaryoblastische Leukämie

Die Formen M0 bis M5 gehen dabei von unreifen weißen Blutzellen aus, die Form M6 von einer unreifen Form der Erythrozyten und die M7 von Megakaryoblasten, die Vorläuferzelle der Thrombozyten.

Die Weltgesundheitsorganisation hat 2008 eine auf genetischen Ursachen aufbauende Klassifizierung eingeführt, die sogenannte WHO-Klassifizierung.[36] Dabei wird die AML in folgende Gruppen eingeteilt:

- AML mit Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 21 [t(8;21)].
- AML mit Translokation oder Inversion zwischen auf Chromosom 16 [t(16;16), inv(16)].
- APL mit dem PML-RARA-Fusionsgen
- AML mit Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 11 [t(9;11)].
- AML mit Translokation zwischen den Chromosomen 6 und 9 [t(6;9)].
- AML mit Translokation oder Inversion auf Chromosom 3 [t(3;3), inv(3)].
- Megakaryoblastische AML mit Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 22 [t(1;22)].
- AML mit dem BCR-ABL Fusionsgen
- AML mit mutiertem NPM1-Gen
- AML mit biallelischer Mutation des CEBPA-Gen
- AML mit mutiertem RUNX1-Gen

Zusätzlich wird in eine AML mit myelodysplastischen Änderungen, myeloides Sarkom und AML mit gemischten Phänotyp unterschieden. Wenn ein Risikofaktor wie das Down-Syndrom oder eine vorhergehende Chemo- oder Bestrahlungstherapie vorliegt, so fallen diese in eigene Kategorien.

Zusätzlich zu dieser Klassifizierung kann das Risiko und die Therapie der Erkrankung anhand verschiedener prognostischer Faktoren eingeschätzt werden. So können

chromosomale Veränderungen wie die Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 21, die häufig in M2-Patienten beobachtet werden, auf eine günstige Prognose hinweisen; eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 auf eine ungünstige Prognose.

Ebenso können spezifische Genveränderungen einen positiven oder negativen Ausblick und eine gezielte Therapie erlauben.[37] Eine AML, die ausschließlich Mutationen im NPM1-Gen oder biallelisch im CEBPA-Gen aufweist, ist mit einem besseren Ausblick verknüpft. Mutationen im *FLT3*-, *TP53*-, *RUNX1*-, oder *ASXL1*-Gen führen ebenso wie CD34 zu einer ungünstigen Prognose. Ebenso wird eine hohe Anzahl an weißen Blutzellen (> 100.000 / mm^3) als unvorteilhaft angesehen.[38]

1.1.4 Inzidenz und Überleben bei AML

Die akute myeloische Leukämie ist mit weltweit ca. 1 Millionen erkrankter Menschen in 2015 die häufigste Form der Leukämie, insgesamt sind 2.3 Millionen Menschen an einer Leukämie erkrankt.[39] Während die AML besonders ältere Menschen betrifft, sind Kinder jünger als 15 Jahre von der ALL betroffen, die in dieser Gruppe die häufigste Art der Leukämie darstellt.[40] Die AML (3.1 Fälle pro 100.000 Einwohner) stellt nach der CLL (4.1 Fälle pro 100.000 Einwohner) die häufigste Leukämieform bei Erwachsenen in Deutschland dar, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen.[41] 50% der Patienten sind älter als 70 Jahre. Die Erfolgswahrscheinlichkeit der Behandlung der AML hängt insbesondere von der Unterform der Leukämie und dem Alter des Patienten ab. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten zwischen 15 und 54 Jahren in den USA bei 47.1% (2003 – 2008) und ist gegenüber früheren Zeiträumen gestiegen (32.6%, 1991 – 1996).[42] Andere Studien zeigen ebenfalls eine starke Korrelation mit dem Alter. So werden in einer anderen Studiengruppe über alle Altersgruppen 5-Jahres-Überlebensraten von 21.4% in den USA beobachtet, wobei sie in den Altersgruppen von 25 – 34 Jahren (62.2%) und 35 – 44 Jahren (60.6%) deutlich höher ist.[43] Die Überlebensraten unterscheiden sich außerdem in Patientengruppen unterschiedlicher Abstammung. So stiegen die Überlebensraten von 1992 bis 2006 für weiße Patienten zwischen 15 und 64 Jahren (28.0% zu 38.8%), blieben für Patienten mit afroamerikanischer Herkunft jedoch unverändert (25.8% zu 26.6%), was ein Hinweis

auf einen erschwerten Zugang zu komplexen Behandlungsmethoden wie beispielsweise einer Knochenmarktransplantation ist.[44] In Deutschland liegt die 5-Jahres-Überlebensrate mit AML bei jüngeren Patienten (15 bis 49 Jahre) bei 57.7%, während sie für Patienten im Alter von 50 bis 69 Jahren bei 27.6% liegt.[41] Bei Patienten, die jünger als 15 Jahre sind, liegt die Überlebensrate bei 78.2% (2009) und ist gegenüber 1999 (61.4%) deutlich angestiegen.[45] Die akute lymphoblastische Leukämie, die die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter darstellt, hat jedoch mit 91.6% deutlich höhere Überlebensraten.

1.1.5 Therapie der AML

Die Behandlung der AML ist abhängig von ihrer zytogenetischen Einstufung und dem Krankheitsverlauf. Während sich manche Formen der chronischen Leukämien so langsam entwickeln, dass es ausreichend sein kann, den Krankheitsverlauf regelmäßig zu beobachten, ist dies bei akuten Leukämien selten der Fall. Aufgrund der nicht-soliden Form und der breiten Verteilung der Leukämien im Körper kann eine chirurgische Entfernung nicht erfolgen. Eine Bestrahlung wird in der Regel nur für das Gehirn durchgeführt, wenn es bereits von leukämischen Blasten infiltriert ist.[46]

Prinzipiell wird bei der Therapie in eine Induktions-, eine Konsolidierungs- und eine Erhaltungsphase unterschieden.[47]
Die Induktionstherapie ist sehr intensiv und kurz. Das Ziel ist die Reduktion der Zahl an Blasten auf eine normale Zahl. Die Konsolidierungstherapie wird durchgeführt, wenn sich der Patient erholt hat. Dazu wird eine Chemotherapie in Zyklen gegeben, damit sich der Körper erholt und eine längere Behandlungsdauer möglich wird, um auch die minimale Resterkrankung zu unterdrücken. In der Erhaltungsphase wird eine Therapie über Monate bis Jahre durchgeführt, um die Krankheit in Remission zu halten.

Die klassische Behandlung besteht in der Kombination verschiedener Chemotherapeutika, die entweder durch orale, subkutane oder intravenöse Gabe verabreicht werden. Chemotherapeutika, auch Zytostatika genannt, sind typischerweise Stoffe, die in Stoffwechselprozesse eingreifen. Da maligne Zellen einen erhöhten Stoffwechsel aufweisen und verringerte Reparaturmechanismen haben, erlauben Zytostatika, trotz ihrer toxischen Wirkung auf gesunde Zellen, eine Therapie. Zytostatika wirken entweder direkt auf die DNA der Zelle, indem sie diese alkylieren, zu Quervernetzungen führen, oder in die Lücken der DNA nicht-kovalent interkalieren (beispielsweise Daunorubicin, Abbildung 2). Sie können aber auch in den Metabolismus eingreifen, wie beispielsweise Folsäureantagonisten oder als nicht-funktionale Pyrimidin- oder Purin-Analoga wirken.

In jüngeren Patienten (unter 60 Jahren) wird häufig zuerst die Induktionstherapie mit Cytarabin (ara-C, 7 Tage) und einem Anthracyclin, wie zum Beispiel Daunorubicin (Tag 1 bis 3; „7+3“-Strategie) begonnen.

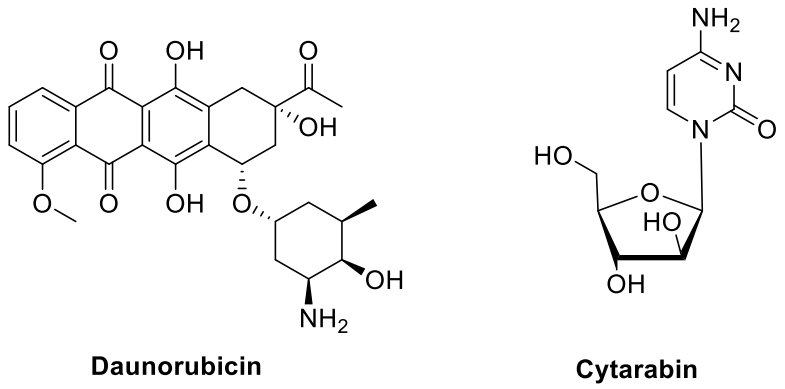
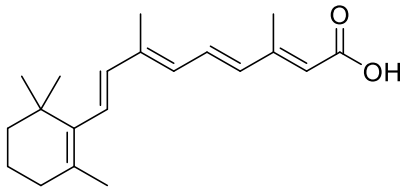


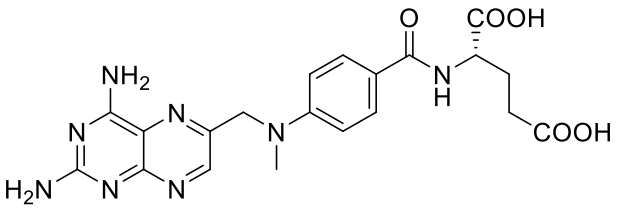
Abbildung 2. Struktur der Chemotherapeutika im Behandlungsmuster mit **Daunorubicin** und **Cytarabin** („7+3“).

Je nachdem, ob zusätzlich ein therapeutisch adressierbarer Faktor vorliegt, kann die Behandlung in Kombination mit dem FLT3-Inhibitor **Midostaurin** (Rydapt®) oder dem CD33-gerichteten Antikörper-Wirkstoff-Konjugat **Gemtuzumab-Ozogamicin** (Mylotarg®) erfolgen.

Die Therapie der akuten promyelozytischen Leukämie (APL, M3) stellt eine Besonderheit dar.[48] Ihre häufigste Ursache ist die chromosomale Translokation des Retinsäurerezeptors-α (RARA) auf Chromosom 17 und des Transkriptionsfaktors *Promyelocytic Leukemia Protein* (PML) auf Chromosom 15. Das Fusionsprotein aus PML und RARA bindet verstärkt an Komplexe aus nuklearen Korepressoren (NCOR) und Histondeacetylasen (HDACs) der DNA und führt somit zu einer blockierten Transkription und Differenzierung von Granulozyten.[49] Durch Bindung von Tretinoin (*all-trans retinoic acid,* ATRA) an RARA wird die Bindung an den NCOR-HDAC-Komplex aufgehoben und die DNA-Transkription wird ermöglicht. Somit kann die Zelle differenzieren und Apoptose eingehen. Die Konsolidierungstherapie kann anschließend mit dem Antifolat **Methotrexat** durchgeführt werden, das strukturell an die Folsäure angelehnt ist, aber dessen Zielenzyme stärker bindet und somit inhibiert.[50]



Tretinoin



Methotrexat

Abbildung 3. Struktur von **Tretinoin** und **Methotrexat** zur chemotherapeutischen Behandlung der APL.

Der Rückgang an leukämischen Zellen und eine Reduktion der Blasten auf 5% wird als komplette Remission bezeichnet. Dabei bestehen keine Zeichen oder Symptome einer Leukämie mehr. Eine vollständige molekulare Remission wird erreicht, wenn selbst mit hochsensitiven Methoden, wie beispielsweise der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Durchflusszytometrie kein Nachweis leukämischer Zellen im Knochenmark gelingt.[51]

Eine minimale Resterkrankung liegt vor, wenn durch einfache diagnostische Verfahren wie beispielsweise mikroskopischer Histologie kein Nachweis von Blasten gelingt, aber durch sensitivere Tests. Ein Rückfall in die Krankheit wird durch ein Vorliegen von mehr als 5% leukämischer Blasten definiert.[52]

1.1.6 Stammzelltransplantation zur Behandlung der AML

Häufig ist eine medikamentöse Therapie zur Behandlung der AML nicht ausreichend. Das kann insbesondere der Fall sein, wenn die Behandlung nicht zu einer Remission führt, also refraktär bleibt oder die Erkrankung nach initialem Behandlungserfolg zurückkehrt, also rezidiviert.[53]

In diesem Fall muss eine Stammzelltransplantation (auch Knochenmarktransplantation) auf die Chemotherapie folgen. Dabei werden dem Patienten durch eine Infusion Stammzellen verabreicht, die neues Knochenmark aufbauen können. Dabei können die Stammzellen aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut, oder in seltenen Fällen aus Nabelschnurblut erhalten werden.[54]

Die Art der Transplantation wird auch nach dem Spender unterschieden. Bei einer allogenen Stammzelltransplantation werden die Zellen von einem Spender mit den gleichen Genmerkmalen gegeben. Diese werden nach dem humanen Leukozytenantigen-System (HLA) eingeteilt, welches für die Erkennung des Immunsystems zuständig sind. Somit müssen die HLA-Merkmale in großen Teilen übereinstimmen, um eine Zurückweisung der fremden Zellen durch das Immunsystem zu verhindern.[55] Spender können entweder aus der Familie kommen, was die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transplantation erhöht, oder nicht verwandt sein. Der Vorteil gegenüber einer Eigenspende, der autologen Stammzelltransplantation, ist einerseits, dass keine Leukämiezellen mit transplantiert werden können, aber auch die Möglichkeit eines *graft-versus-leukemia* Effekts. Dabei werden die Leukämiezellen von den Leukozyten des Spenders erkannt und abgebaut. Ein Nachteil dieser Transplantation ist die auf den gleichen Effekt beruhende *graft-versus-host*-Erkrankung.[56] Dabei wird der Körper des Empfängers als fremd erkannt und die Wirkung des adaptierten Immunsystems kann zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Bei der autologen Stammzelltransplantation werden dem Patienten vor der Chemotherapie Stammzellen entfernt. Die leukämischen Zellen werden im Labor durch Chemotherapie getötet[57] oder durch Zelloberflächenmarker selektiert[58] und die nicht-leukämischen Zellen dem Patienten wieder zugeführt. Dieser Ansatz ist jedoch nur vereinzelt in klinischen Studien untersucht worden.[59]

1.1.7 Entwicklung neuer Therapien für die AML

Die hohe Mortalitätsrate und die nur eingeschränkt wirksamen und aggressiven Therapien zeigen den ungedeckten Bedarf an besser wirksamen Therapeutika.
Die Entwicklung moderner Therapien befasst sich einerseits mit der optimierten klinischen Anwendung der zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika, beispielsweise in Kombinationstherapien,[60] sowie inkrementellen Verbesserungen, beispielsweise in der Wirkstoffformulierung.[61]
Das steigende Verständnis der molekularen Eigenschaften verschiedener Unterformen der AML führte jedoch seit den 1990er Jahre zur Entwicklung zielgerichteter Therapien, die an häufig beobachteten Mutationen ansetzen, die als krankheits-auslösend betrachtet werden.[62]
Das am häufigsten mutierte Gen bei AML stellt das für die *FMS-like tyrosine kinase* 3 (FLT3) kodierende Gen dar. Bei FLT3 handelt es sich um eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die seit mittlerweile zwei Jahrzehnten Gegenstand der Wirkstoffforschung ist. Die onkogene Wirkung beruht häufig auf Mutationen in der Juxtamembrandomäne (JM) der FLT3-Kinase, den sogenannten internen Tandemduplikationen (ITD), die in ca. 25% der Patienten beobachtet werden. Diese führen zur Liganden-unabhängigen Autophosphorylierung der Kinase und aktiviert Substratproteine, welche wiederum nachgeschaltete Signalwege aktivieren.[63] Punkt-Mutationen in den Aminosäuren der Kinase-Domäne von FLT3 (bspw. D835Y) treten in 10% der Patienten auf und destabilisieren die inaktive Kinasekonformation, wodurch das Gleichgewicht der Regulierung verschoben ist und die Aktivität der Kinase steigt.[64]
Trotz der vielfältigen Bemühungen in der Wirkstoffforschung konnte erst im Jahr 2017 mit **Midostaurin** (**PKC412**, Abbildung 4) der erste Wirkstoff, der auf die Inhibition der FLT3 Kinase zielt, in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zugelassen werden.[65] **Midostaurin** ist von dem Naturstoff **Staurosporin** abgeleitet und bereits seit 2002 in der klinischen Entwicklung.[66] Hierbei zeigt sich ein um 22% verringertes Risiko, an der Krankheit zu sterben. Des Weiteren befinden sich eine Reihe von FLT3-Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkungsweisen und Selektivitätsprofilen in klinischer Entwicklung, die im späteren Verlauf dieser Arbeit diskutiert werden.

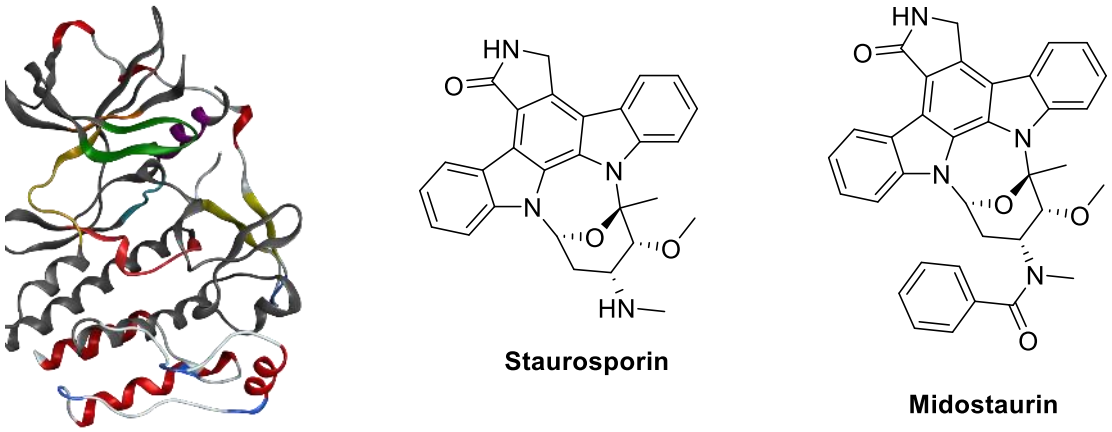


Abbildung 4. Strukturen der Kinase-Domäne von FLT3 (PDB: 1RJB),[67] des Naturstoffs **Staurosporin** und des zur Behandlung der AML zugelassenen Wirkstoffs **Midostaurin**.

In ca. 20% der Patienten mit AML werden Mutationen im Gen für die Isocitratdehydrogenase 1 oder 2 (IDH1 / IDH2) gefunden.[68] Diese kodieren für die IDH1- / IDH2-Enzyme und katalysieren in gesunden Zellen die Decarboxylierung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat. In der mutierten IDH wird jedoch die Umsetzung von α-Ketoglutarat (α-KG) zu *(R)*-2-Hydroxyglutarat (*(R)*-2-HG) katalysiert, das ein Onkometabolit darstellt und wiederum verschiedene α-KG-abhängige Enzyme inhibiert. Dazu gehören DNA-regulierende Enzyme wie Histon-Lysin-Demethylasen[69] und 5-Methylcytosin-Hydroxylasen,[70] wodurch eine Differenzierungsblockade ausgelöst wird. Die Inhibition der IDH1 oder IDH2 führt somit zur Differenzierung in reife, myeloide Zellen.

Ivosidenib (Tibsovo®) wurde 2018 zur Behandlung IDH1-mutierter refraktärer oder rezidivierter AML zugelassen. Die Zulassung basierte auf einer Phase 1-Studie, in der 25% der Patienten mit vorbehandelter, refraktärer oder rezidivierter AML eine komplette Remission mit mittleren Ansprechrate von 8.2 Monaten erreichten,[71] während sie bei einer randomisierten Phase 3 Studie in dieser Gruppe mit konventioneller Chemotherapie nur bei 3.3 Monaten lag.[72] **Enasidenib** (Idhifa®) ist der erste zugelassene IDH2-Inhibitor und ist in den USA seit 2017 zur Behandlung refraktärer beziehungsweise rezidivierter AML zugelassen, bei der eine IDH2-Mutation nachgewiesen wurde.[73]

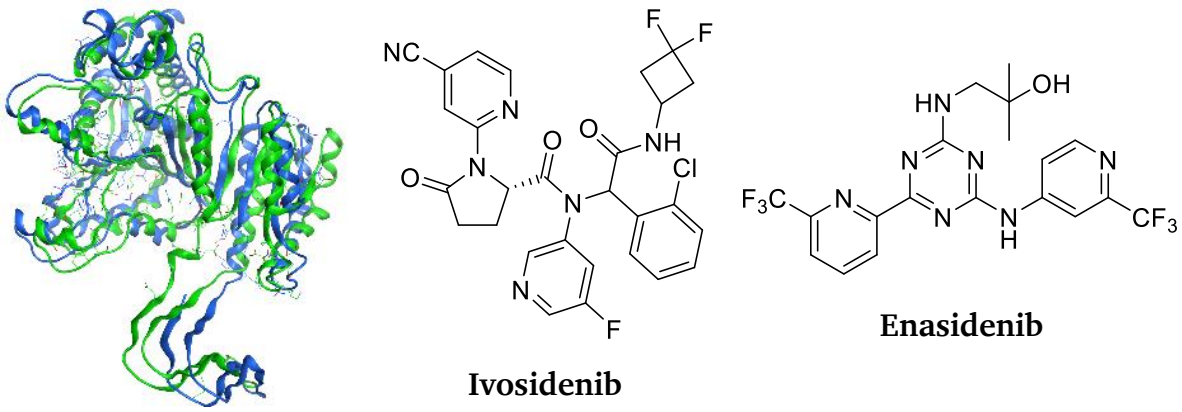
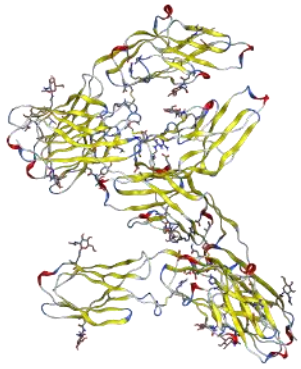


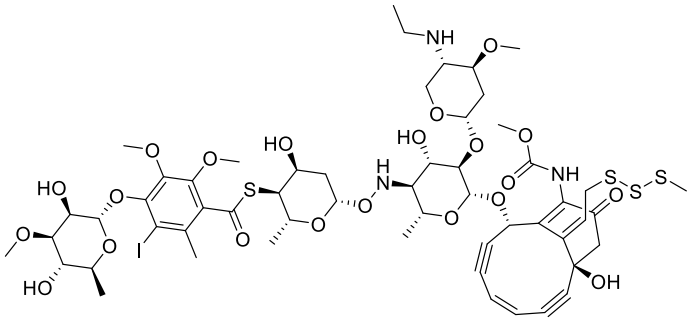
Abbildung 5. Struktur von IDH1 (blau) und IDH2 (grün) und der selektiven Inhibitoren **Ivosidenib** (IDH1-Inhibitor) und **Enasidenib** (IDH2-Inhibitor).[74],

Enasidenib ist oral verfügbar, verringert das *(R)*-2-HG-Level und induziert myeloide Zelldifferenzierung.[75] Das mediane Überleben in einer Phase 1/2-Studie bei intensiv vorbehandelten Patienten, die bereits mit mindestens zwei Chemotherapien behandelt wurden, lag bei 8 Monaten und einer Ansprechrate von 40%.[72]

Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg®) war das erste zugelassene Antikörper-Wirkstoff-Konjugat überhaupt und war von 2000 bis 2010 zur Behandlung CD33-positiver AML bei Patienten, die nicht für eine Chemotherapie geeignet sind, in den USA zugelassen (Abbildung 6).[76] Es wurde vom Markt zurückgezogen, nachdem konfirmatorische Studien gescheitert waren,[77] sowie behandlungsbezogene Todesfälle[78] und Sicherheitsbedenken auftraten.[79] Seit 2017 ist es in geringerer Dosis und in Kombination mit Chemotherapie („7+3“) erneut zur Behandlung refraktärer oder rezidivierter AML zugelassen.[80] Die mittlere Überlebensrate konnte von 21.8 Monaten in der Kontrollgruppe auf 27.5 Monate erhöht werden.[81]
Das CD33-Antigen ist ein Lektin, das bei ca. 80% der AML-Patienten auf der Oberfläche myeloider Zellen exprimiert wird. Der Antikörper **Gemtuzumab** bindet an CD33 und führt zur Internalisierung und Degradierung des Rezeptor-Antikörper-Komplex, wodurch das Toxin **Calicheamicin γ1** frei wird und somit in den CD33-positiven Zellen selektiv zytotoxisch wirkt. Es bindet in die kleine Furche der DNA, wodurch in einer Reaktion, analog zur Bergmann-Zyklisierung, ein 1,4-Didehydrobenzol Diradikal gebildet wird.[82] Dieses wiederum abstrahiert Wasserstoff-Atome des Desoxyribose-Rückgrats der DNA und führt zu Doppelstrangbrüchen, wodurch Apoptose induziert wird.



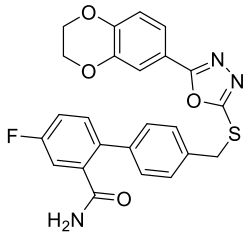
CD33 Rezeptor



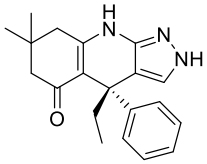
Calicheamicin γ1

Abbildung 6. Struktur des Immunrezeptors CD33 für **Gemtuzumab** (PDB: 5IHB) und des konjugierten Toxins **Calicheamicin γ1**.

Neben diesen zugelassenen Behandlungsansätzen befinden sich weitere Therapiestrategien zur Behandlung der AML in der experimentellen Entwicklung. Eine weitere, vielversprechende Therapiestrategie stellt die Inhibition der Glykogen Synthase Kinase 3 α (GSK3α) dar. Die GSK3-Familie beinhaltet zwei hoch homologe, konstitutiv aktive Serin/Threonin-Kinasen, die den Glykogen-Metabolismus und Apoptose-Signalwege regulieren und mit verschiedenen Krankheiten assoziiert werden.[83] Die GSK3α-Isoform wurde 2012 in einem kombinierten genetischen und chemischen *Screening* als Zielenzym zur Differenzierung von Myeloblasten identifiziert.[84] Entscheidend für die Wirkstoffentwicklung ist die selektive Inhibition der GSK3α-Isoform, um die physiologische Wirkung der GSK3β-Isoform aufrecht zu erhalten. Transkriptionelle Aktivierung und nachfolgende Differenzierung konnte weiterhin mit dem FDA-zugelassenen Inhibitor LiCl bei Tretinoin-resistenten APL-Zelllinien beobachtet werden.[85] Die GSK3α-selektiven Inhibitoren **BRD0705**[86] und **BSc5090**[87] (Abbildung 7) induzieren myeloide Differenzierung und verringern die Kolonien-Bildung in verschiedenen AML-Zelllinien. **BRD0705** ist nicht toxisch gegenüber der normalen Hämatopoese und erhöht zudem das Überleben in Mausmodellen der AML.



BSc5090



BRD0705

Abbildung 7. Struktur der GSK3α-selektiven Kinase-Inhibitoren **BSc5090** und **BRD0705**.

1.2 Kinasen als Zielproteine in der Wirkstoffentwicklung

1.2.1 Funktion und Klassifizierung von Proteinkinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, die den Transfer einer Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf Substratproteine katalysieren und somit dessen biologische Funktion regulieren. Die Phosphorylierung kann über Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Reste vermittelt werden. Die Abspaltung einer Phosphatgruppe von einem Substratprotein erfolgt durch Phosphatasen, wodurch ein Gleichgewicht aktivierter und nicht-aktivierter Substrate vorliegt. Eine Verschiebung des Gleichgewichts durch die unterschiedliche Aktivität von Kinasen und Phosphatasen erlaubt somit die Regulation physiologischer Prozesse, aber kann andererseits, bei einer fehlerhaften Regulation, die Entwicklung von Krankheiten verursachen.[88]

Die erste Sequenz einer Proteinkinase, der Protein-Kinase A, wurde 1981 bestimmt.[89] An ihr konnte auch im Jahr 1991 die erste Struktur einer Kinase aufgeklärt werden.[90] Ungefähr 2% des menschlichen Genoms kodieren für 518 verschiedene Proteinkinasen.[91]

Die Unterteilung der Proteinkinasen erfolgt in 7 Kinase-Gruppen anhand ihrer Aufgaben, Sequenzidentität und -homologie (Abbildung 8).[92] Die AGC-Gruppe ist nach den Proteinkinasen A, C und G benannt und bestehen aus intrazellulären Signalkinasen, die durch zyklische Nukleotide, Phospholipide und Calcium moduliert werden. Die CMGC-Gruppe ist nach den Untergruppen der CDK-, MAPK, GSK3- und CLK-Kinasen benannt, die intrazelluläre Signalwege und den Zellzyklus regulieren. Die CAMK-Familie ist nach Calmodulin/Calcium-regulierte Kinasen benannt. Die CK1-Familie besteht aus wenigen, eng mit einander verwandten Kinasen die nur eine geringe Homologie zu anderen Familien hat. Die STE-Familie besteht aus einander sequentiell aktivierenden Kinasen, die unter anderem die MAPK-Kinasen aktivieren. Die Mitglieder der Tyrosin-Kinase-Familie (TK) phosphorylieren fast ausschließlich Tyrosin-Reste in Substraten, während die eng verwandten Mitglieder der Tyrosin-ähnlichen Kinase-Familie (TKL) Serin- und Threonin-Reste phosphorylieren. Zusätzlich gibt es noch eine

Reihe atypischer Kinasen, die im Kinase-Dendrogramm nicht zugeordnet werden können. Innerhalb der Kinase-Gruppen werden wiederum verschiedene Kinase-Familien anhand ihrer Sequenzähnlichkeit unterteilt.

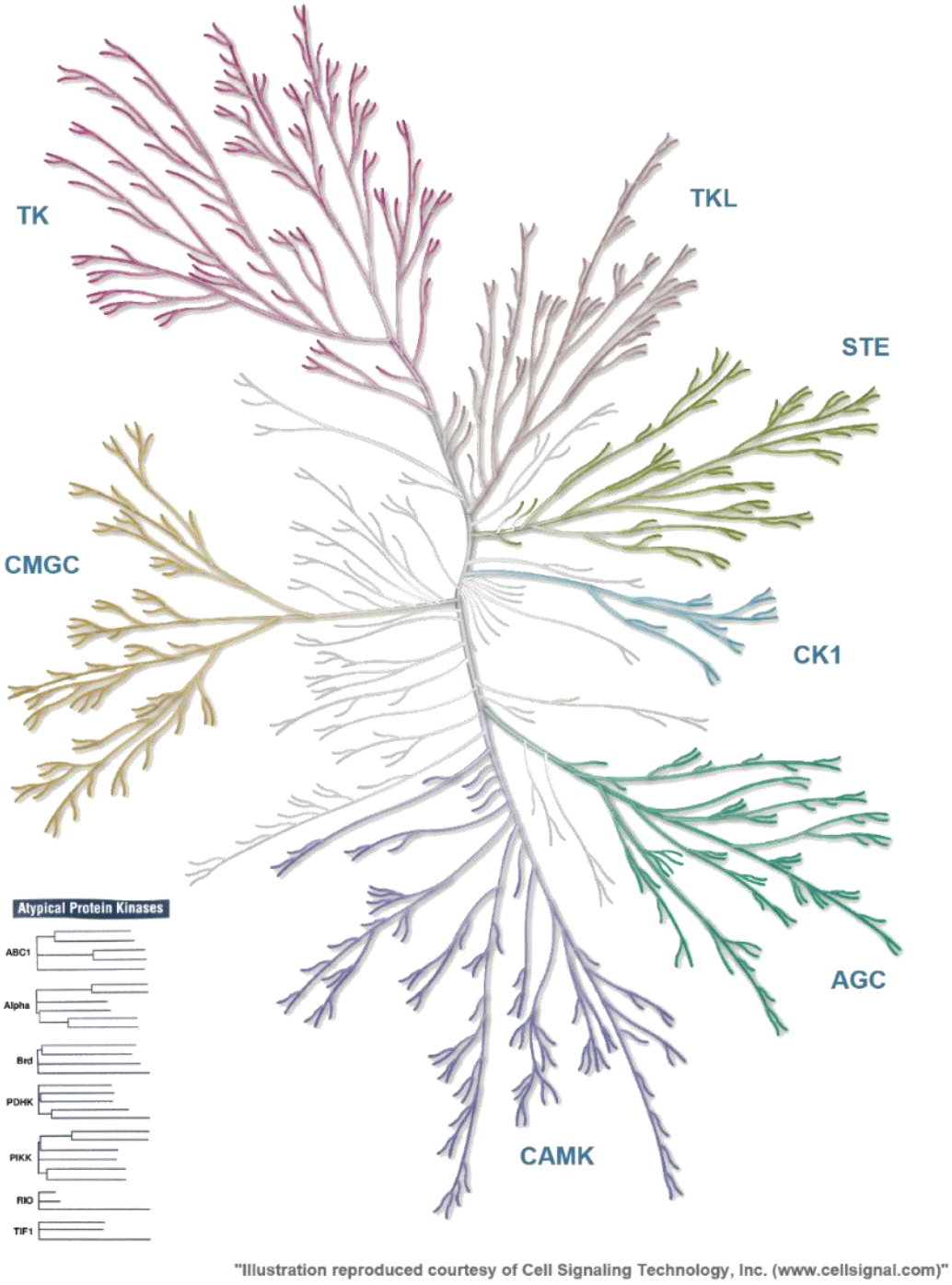


Abbildung 8. Kinase-Dendrogramm der TK, TKL, STE, CK1, AGC, CAMK und CMGC-Kinase-Gruppen und atypische Kinasen. Die Abbildung wurde mit KinMap erstellt.[93]

1.2.2 Struktur von Proteinkinasen

Kinasen haben eine N-terminale Region (*N-lobe*), die für die Bindung von ATP zuständig ist, und eine C-terminale Region (*C-lobe*), welche für die Bindung des Substratpeptids und die Katalyse zuständig ist (Abbildung 9). Alle Kinasen besitzen eine in der Sekundärstruktur konservierte Kerneinheit, die, je nach Kinase-Familie, um regulatorische Einheiten oder zusätzliche Bindungsstellen ergänzt wird.

In Abbildung 9 sind die zentralen, konservierten Untereinheiten von Proteinkinasen farblich hervorgehoben. Die Glycin-reiche Schleife (*glycine-rich loop*, grün) hat ein in den meisten Kinasen konserviertes GxGxxG-Motiv, das für die korrekte Positionierung des nicht-transferierten β-Phosphats in ATP zuständig ist. Die Untereinheit 2 (orange) wirkt zusammen mit der α-C-Helix (violett), die das einzige helikale Element in der *N-lobe* ist, an der Regulierung der aktiven und inaktiven Konformation mit. Die Untereinheit 5 (*Hinge*-Region, gelb) verbindet die *C-lobe* mit der *N-lobe*. Die katalytische Schleife (rot) koordiniert den für die Katalyse wichtigen Kofaktor Mg^{2+}, der wiederum das nicht-transferierte α- und β-Phosphat von ATP koordiniert. Die Aktivierungsschleife (cyan) moduliert die Kinaseaktivität und die Substratbindung, sie beinhaltet das konservierte DFG-Motiv.[94]

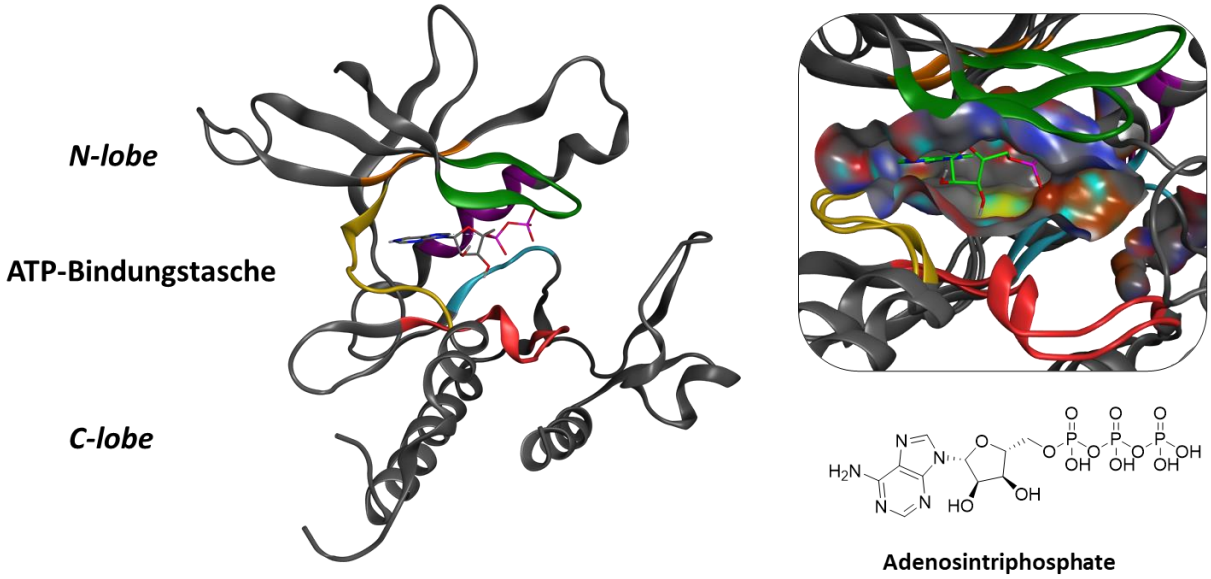


Abbildung 9. Übersicht der Architektur von Proteinkinasen. Die Glycin-reiche Schleife (grün, Untereinheit 1), die Untereinheit 2 (orange) und die α-C-Helix (violett, Untereinheit 3) liegen in der *N*-terminale Region der Kinase. Die *Hinge*-Region (Untereinheit 5, gelb) verbindet die beiden Regionen der Kinase. Die katalytische Schleife in der *C-lobe* ist an der Koordination der Ribose-Gruppe von ATP und des katalytisch aktiven Mg^{2+} beteiligt.

Die Bindung von ATP und die Positionierung des γ-Phosphat-Restes zur Übertragung erfolgt zwischen der *C*- und der *N-lobe* in der ATP-Bindungstasche (Abbildung 10). Die synergistische Wirkung der verschiedenen Strukturmotive bei der Regulierung von Proteinkinasen ist im Folgenden anhand des ADP-cKIT-Komplexes erklärt (PDB: 1PKG, Abbildung 11).[95] cKIT ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase der PDGF-Rezeptor-Familie, die eine hohe Homologie zu FLT3 aufweist, dessen Struktur in der aktiven Konformation jedoch nicht aufgeklärt ist. Der Adenin-Heterozyklus bindet durch alternierende, tridentate Wasserstoffbrückenbindungen an die Aminosäure-Rückgrat-Atome der *Hinge*-Region. Dabei agiert die dem *Gatekeeper*-Rest (GK, Thr670 in cKIT) benachbarte Aminosäure (GK+1) als Wasserstoffbrücken-Akzeptor, das N-seitige Amid des „GK+3"-Restes als Wasserstoffbrücken-Donor und das C-seitige Amid als Wasserstoffbrücken-Akzeptor. Die Ribose-Einheit von ATP wird durch Arg796 in der katalytischen Schleife koordiniert und das benachbarte Asn797 bindet den katalytischen Kofaktor Mg^{2+}. Das α- und β-Phosphat bildet Wasserstoffbrücken sowohl zu dem konservierten Lys623, als auch dem Peptidrückgrat-Atomen der Glycin-reichen Schleife aus.

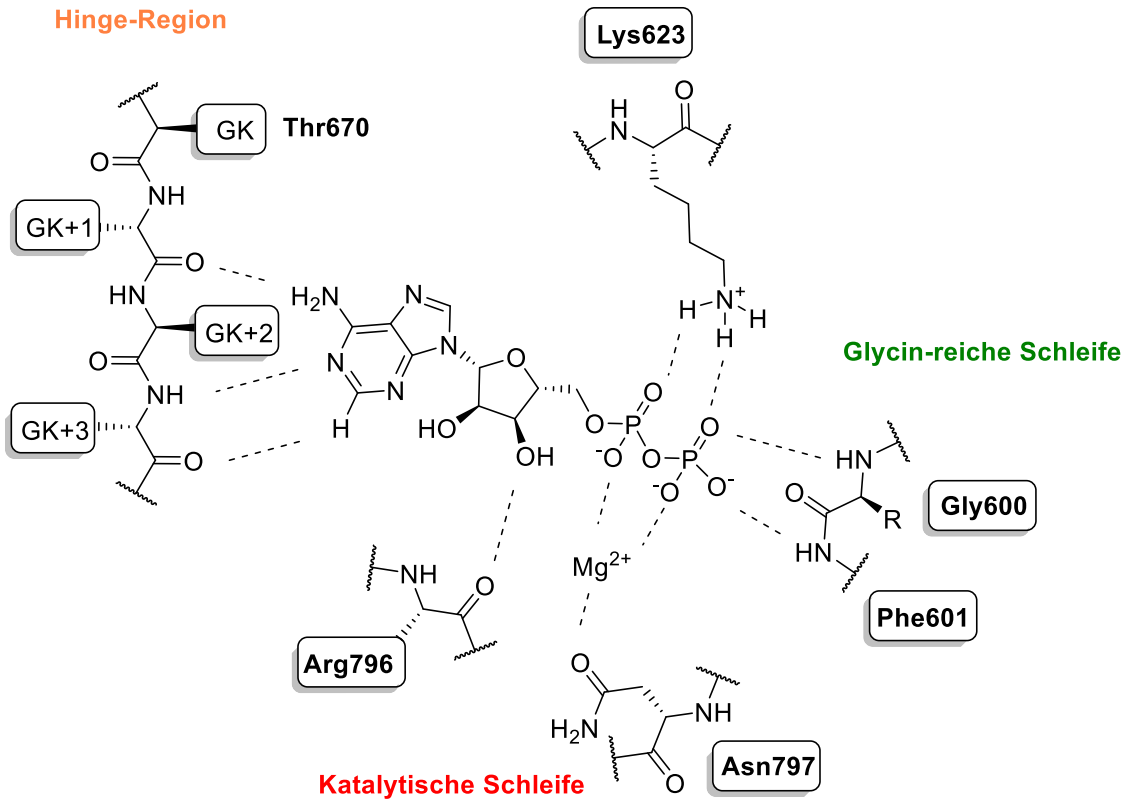


Abbildung 10. Interaktion von ADP in der ATP-Bindungstasche von cKIT (PDB: 1PKG).

Die Übertragung des γ-Phosphats erfolgt auf verschiedene Tyrosin-Reste in der Juxtamembrandomäne und der Aktivierungsschleife einer Kinase und ermöglicht die Phosphorylierung von Substratproteinen. Der Übergang von der aktiven zur inaktiven Konformation der Kinase führt teilweise zu massiven konformativen Änderungen der einzelnen Untereinheiten (Abbildung 11). So liegt der Phenylalanin-Rest des DFG-Motivs in der inaktiven Konformation der Kinase in der Ribose-Bindetasche, wodurch sich die Glycin-reiche Schleife von der ATP-Bindungsstelle entfernt. Dadurch wird eine regulatorische Tasche geöffnet, in welcher in der aktiven Konformation das Phenylalanin des DFG-Motivs liegt. Das Lys623 der Untereinheit 2 bildet in der inaktiven Konformation der Kinase eine Salzbrücke mit Glu640, die in der aktiven Form aufgehoben ist.

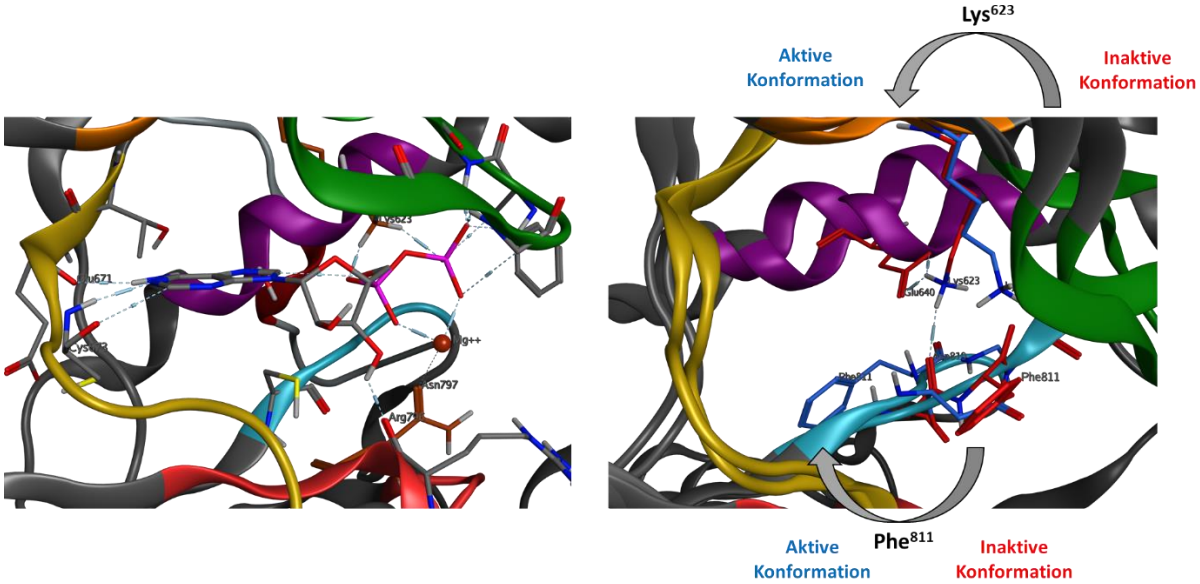


Abbildung 11. Bindung von ATP in der aktiven Kinase-Form von cKIT (links) und konformative Änderungen in der ATP-Bindungstasche der aktiven, mit ADP gebundenen (rechts; blau; PDB: 1PKG)[95] und der inaktiven, mit dem Inhibitor **Imatinib** gebundenen (rechts; rot; PDB: 1T46)[96] Konformation der Kinase.

Die Regulierung der Kinaseaktivität erfolgt bei Rezeptor-Tyrosinkinasen in der Regel über eine *N*-terminale, extrazelluläre Domäne, die, je nach Unterfamilie, beispielsweise Immunoglobin-ähnlich (RTK III) sind und nach Bindung eines Liganden zu einer Rezeptordimerisierung und einer anschließenden gegenseitigen Phosphorylierung führen.[97] Dadurch können Bindestellen für Substratproteine oder Transkriptionsfaktoren entstehen und die Signalweiterleitung aktiviert werden. Manche Kinasen verfügen zusätzlich über eine Modifikationsstelle für zum Beispiel Myristinsäure, die eine Assoziation einer Kinase an die Zellmembran erlaubt.[98]

1.2.3 Inhibition von Protein-Kinasen

Es gibt verschiedene Strategien zur Inhibition von Proteinkinasen, die teilweise ergänzend zueinander verwendet werden können.
Protein-Kinasen können entweder durch kleine Moleküle inhibiert werden, die in der ATP-Bindetasche oder einer allosterischen Bindetasche der Kinase-Domäne binden. Hierbei wird in der Regel ATP der Zugang zur Bindetasche mit einem Inhibitor versperrt, der eine höhere Affinität zur Kinase hat als ATP, wodurch eine Phosphorylierung der Kinase und damit von Substratproteinen nicht möglich wird. Rezeptor-Tyrosinkinasen können außerdem extrazellulär durch spezifische Antikörper inhibiert werden,[99] aber auch durch kleine Moleküle.[100]

Dar und Shokat haben 2011 drei Klassen von Kinase-Inhibitoren definiert, die als Typ I, II und III bezeichnet werden.[101] Typ I-Inhibitoren binden an die aktive Konformation der Kinase (DFG-*in,* αC-Helix-*in*), Typ II-Inhibitoren an die inaktive Konformation der Kinase (DFG-*out,* αC-Helix-*out*) und Typ III-Inhibitoren als allosterische Inhibitoren nicht-ATP-kompetitiv. Im Kontext der Kinase wird ein allosterischer Inhibitor typischerweise so bezeichnet, wenn er nicht in der ATP-Tasche bindet. Zuccotto et al. haben zusätzlich Typ $I^{1/2}$-Inhibitoren definiert, die in der DFG-*in* und αC-Helix-*out* Konformation binden. Gavrin und Saiah haben allosterische Inhibitoren zusätzlich in Typ III- und Typ IV-Inhibitoren unterteilt, wobei Typ III-Inhibitoren zwischen der *N*- und der *C-lobe*, Typ IV-Inhibitoren außerhalb binden. Lamba und Gosh haben Typ V-Inhibitoren definiert, die zwei Regionen der Kinase-Domäne binden.[102] Kovalente Inhibitoren wurden von Roskoski als Typ VI-Inhibitoren definiert, wobei diese Bezeichnung noch wenig gebräuchlich ist. Eine weitere Unterscheidung wurde 2016 von Roskoski eingeführt, welche Typ $I^{1/2}$- und Typ II- Inhibitoren zusätzlich in Typ A-Inhibitoren, welche die regulatorische Tasche besetzen, und Typ B-Inhibitoren, die dort nicht binden, unterteilt.[103]

1.2.4 Klinisch zugelassene Kinase-Inhibitoren

In diesem Kapitel sollen Beispiele für typischer Vertreter dieser Inhibitor-Klassen vorgestellt werden. **Imatinib** (Gleevec®, Abbildung 12) war der erste zugelassene Kinase-Inhibitor und ist unter anderem zur Behandlung der CML und ALL mit Expression des Philadelphia-Chromosoms zugelassen.[104] Das Philadelphia-Chromosom entsteht durch reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 und führt zur Bildung des BCR-ABL1 Onkogens.[105] Das entstehende Fusionsprotein ist Auslöser der CML, die durch **Imatinib** erstmals zielgerichtet behandelt werden konnte. **Imatinib** besetzt die regulatorische Tasche und bindet Kinasen als Typ IIB-Inhibitor (DFG-*out*, αC-Helix-*out*). **Imatinib** inhibiert auch die cKIT-Kinase, weshalb es zur Behandlung von gastrointestinalen Stroma-Tumoren zugelassen wurde, und die PDGF-Rezeptor Isoformen.[106]

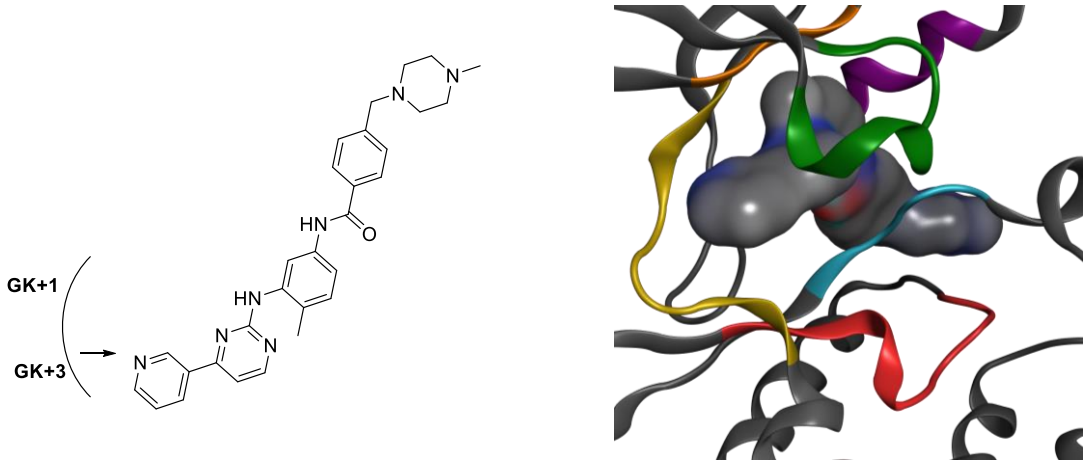


Abbildung 12. Struktur von **Imatinib** und Bindungskomplex mit der Abl-Proteinkinase (PDB: 2HYY).[107]

Der Naturstoff **Staurosporin** ist ein Indolocarbazol und Typ I-Kinase-Inhibitor, der vom Bakterium *Streptomyces staurosporeus* isoliert wurde und viele Kinasen verschiedener Gruppen mit hoher Affinität bindet (Abbildung 13).[108] Ursache dafür ist die Interaktion mit den konservierten Hauptketten-Atomen in der *Hinge*-Region und der katalytischen Schleife. Während Derivate des **Staurosporins** in der klinischen Entwicklung sind bzw. im Fall von **Midostaurin**,[109] zur Behandlung zugelassen sind, ist **Staurosporin** selbst aufgrund seiner promiskuitiven Wirkung als Forschungswerkzeug interessant.[110]

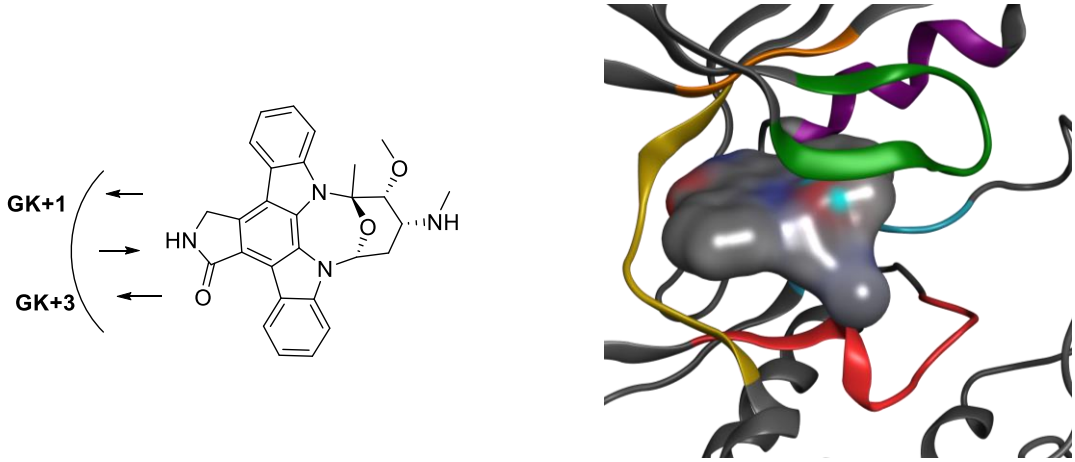


Abbildung 13. Struktur von **Staurosporin** und Bindungskomplex mit der CDK2-Proteinkinase (PDB: 4ERW).[111]

Sunitinib ist ein Multikinase-Inhibitor insbesondere von Tyrosinkinase (TKI) und zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms und **Imatinib**-resistenten gastrointestinalen Stroma-Tumoren zugelassen (Abbildung 14).[112] **Sunitinib** inhibiert alle Tyrosinkinasen der PDGF-Rezeptorfamilie (u.a. FLT3, cKIT, PDGFRα/β) und die VEGFR-Rezeptorfamilie, die eine Rolle in der Tumorangiogenese und -proliferation einnehmen.[113] Er besetzt im Gegensatz zu den meisten anderen Kinase-Inhibitoren weder die hydrophobe, regulatorische Tasche, noch die Ribosebindetasche. In der Literatur ist der Bindungsmodus als Typ I-Inhibitor,[111] Typ II-Inhibitor[114] oder Typ IV-Inhibitor[115] beschrieben.

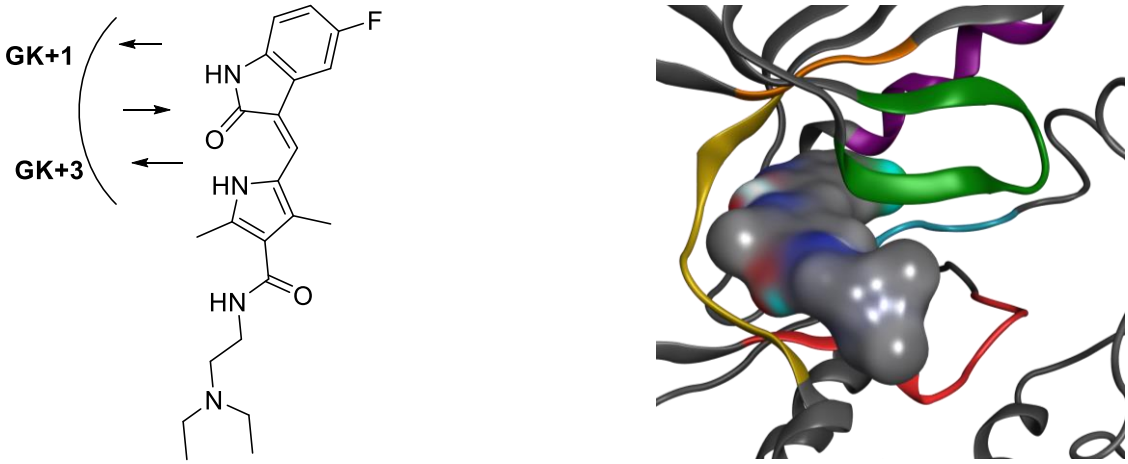


Abbildung 14. Struktur von **Sunitinib** und Bindungskomplex mit CDK2 (PDB: 3TI1).[111]

Imatinib, **Staurosporin** und **Sunitinib** zeigen deutlich unterschiedliche Selektivitätsmuster in der Inhibition von Kinasen (Abbildung 15). So ist **Imatinib** einer der selektivsten Inhibitoren, der ausschließlich einige Kinasen der TK-Familie inhibiert.

Staurosporin ist aufgrund seiner promiskuitiven Wirkung therapeutisch nicht geeignet.[116] **Sunitinib** ist deutlich selektiver als Staurosporin, bei der Behandlung treten jedoch Nebenwirkungen auf, die der geringen Spezifität zugeschrieben werden.[117]

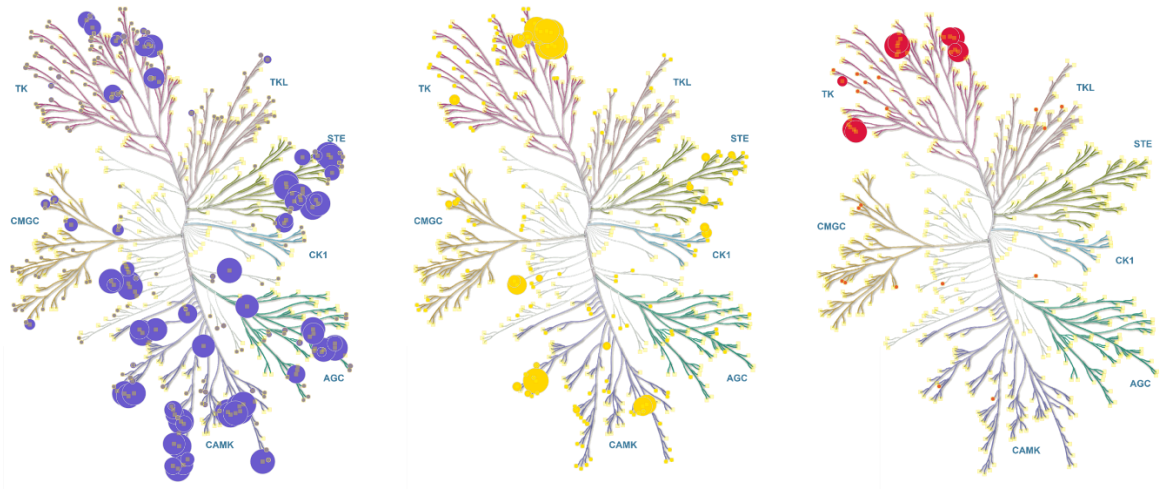


Abbildung 15. Vergleich der Inhibition von Kinasen durch **Staurosporin** (blau), **Sunitinib** (gelb) und **Imatinib** (rot). *Illustration reproduced courtesy of CellSignalling.com.*[93] Gezeigt sind K_d-Werte < 1000 nM, wobei die Kreisgröße eine Abschätzung der biologischen Aktivität erlaubt.[110]

1.3 Kovalent bindende Inhibitoren

Kovalent bindende Enzym-Inhibitoren bilden eine chemische Bindung zwischen einer nukleophilen Aminosäuren-Seitenkette des Zielproteins und einer chemisch reaktiven, elektrophilen Gruppe (CRG) des Liganden, dem sogenannten *Warhead*.[118-119] Die Bildung der kovalenten Bindung geschieht typischerweise, nachdem sich ein starker, reversibler Komplex zwischen Ligand und Enzym gebildet hat und dieser das Elektrophil in die Nähe der nukleophilen Aminosäure gebracht hat. Die Bindungsbildung kann dabei reversibel oder irreversibel sein, sodass ferner kovalent-reversible und kovalent-irreversible Inhibitoren unterschieden werden. Bei einer irreversiblen Inhibition liegt eine nicht-Gleichgewichtskinetik vor, da durch den fehlenden Dissoziationsschritt das Elektrophil nicht wieder freigesetzt wird. Damit kann die Funktion des Enzyms nur durch eine Neu-Synthese wiederhergestellt werden. Dadurch ändert sich die Verweilzeit des Inhibitors im Zielenzym und damit die eigentliche Stärke der Inhibition erheblich. Diese ist für einen reversiblen Inhibitor als $t_R = k_{off}^{-1}$ definiert, für einen irreversiblen Inhibitor jedoch theoretisch unendlich groß.

Praktisch verliert sie aber durch den Abbau des modifizierten Proteins und Neu-Synthese des Proteins an systemischer Wirkung.[120]

Dabei kann *in vivo* eine Verringerung der Wirkung durch unspezifische Alkylierung von nicht-Ziel Makromolekülen oder von ubiquitär vorkommenden Nukleophilen, wie Glutathion auftreten.[121]

Lange Zeit wurde dieser Ansatz aufgrund seiner potentiellen Toxizität nicht für die zielgerichtete Therapie verwendet. Wenn jedoch eine selektive kovalente Inhibition möglich ist und keine Enzym-intrinsische Toxizität vorliegt, kann der irreversible Mechanismus zu einer höheren therapeutischen Breite führen und eine geringere Wirkstoffkonzentration ermöglichen.

Eine Reihe von heute unverzichtbaren Medikamenten sind kovalent-bindende Inhibitoren, obwohl sie nicht mit dieser Absicht entwickelt wurden. Dazu gehören Wirkstoffe, die Disulfid-Addukte mit ihren Zielenzymen bilden, wie **Omeprazol**,[122] das ein Protonenpumpenhemmer ist, und **Clopidogrel**,[123] das ein Thrombozyten-aggregationshemmer ist. Andere Wirkstoffe wirken über eine irreversible, kovalente Modifikation einer nukleophilen Seitenkette im aktiven Zentrum. Dazu gehören **Aspirin**, das ein Serin in der Cyclooxygenase 1 und 2 acyliert und damit inhibiert,[124] und **Penicillin G**, dessen β-Lactam-Ring durch einen Serin-Rest in Penicillin-bindenden Proteinen irreversibel geöffnet wird.[125] Von den 74 Enzymen, die durch zugelassene Wirkstoffe inhibiert werden, werden 19 auch durch irreversibel bindende Inhibitoren blockiert.[126]

Zu den Nukleophilen zählen, aus dem Fundus der proteinogenen Aminosäuren, Cystein,[127] Lysin,[128] Threonin[129] und Serin[129]. Neue Beispiele zeigen auch die Bindung an Methionin.[130-131]

Ein Spezialfall sind reversibel oder kovalent-reversibel bindende Inhibitoren, die durch ihre langsame *off*-Rate pseudo-irreversibel wirken. Beispiele hierfür sind Angiotensin II Rezeptorantagonisten wie **Candesartan**[132] und Protease-Inhibitoren wie der HIV-1-Protease-Inhibitor **Darunavir**[133] oder der Proteasom-Inhibitor **Bortezomib**.[134]

1.3.1 Entwicklung von kovalent-bindenden Kinase-Inhibitoren

Kovalent-bindende Kinase-Inhibitoren werden typischerweise durch die strukturbasierte Verknüpfung eines submikromolar bindenden, reversiblen Kinase-Inhibitors mit einem Elektrophil erzeugt, wobei typischerweise ein nukleophiles Cystein adressiert wird. Dieser Ansatz ist besonders interessant, da eine Reihe von Cystein-Resten in der ATP-Bindungstasche bekannt sind und dabei, im Gegensatz zu Cystein-Proteasen und -phosphatasen in der Regel keine Rolle im Katalyse-Zyklus einnehmen (Abbildung 16).[127] Dabei bilden kovalente Kinase-Inhibitoren typischerweise zuerst einen nicht-kovalenten Komplex aus, wobei nach Einnehmen einer geeigneten Trajektorie eine kovalente Bindungsbildung stattfindet. Durch die Kombination von reversiblen und kovalenten Wechselwirkungen kann anschließend idealerweise eine erhöhte Selektivität und Wirkung erzeugt werden. Geeignete Cystein-Reste liegen auf der Glycin-reichen Schleife, der *Hinge*-Region oder um das DFG-Motiv herum. Insgesamt besitzen mehr als 200 Kinasen mindestens einen dieser Cystein-Reste. Aufgrund der hohen Konservierung der Kinase-Architektur zwischen verschiedenen Familien lassen sich anhand des Vorliegens bestimmter Reste Selektivitäten abschätzen.

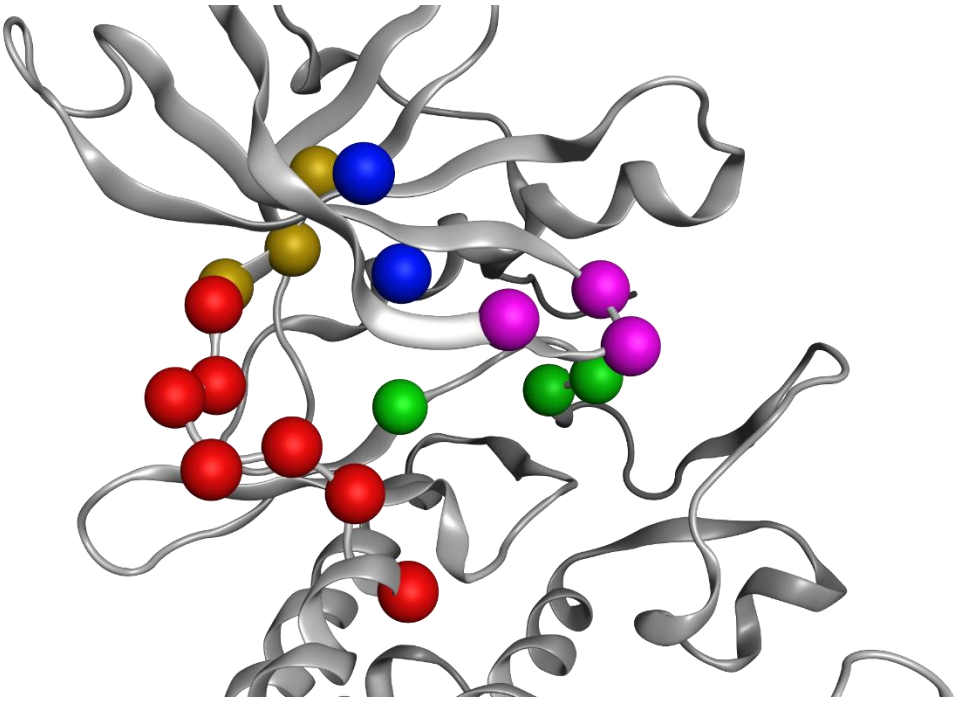


Abbildung 16. Darstellung des Proteinkinase-Cysteinoms. Rot: Mögliche Cystein-Reste auf der *Hinge*-Region. Gelb: *Gatekeeper* und benachbarte Reste. Blau: Reste auf der Glycin-reichen Schleife nahe der ATP-Bindetasche. Lila: Flexible Region der Glycin-reichen Schleife. Grün: Reste auf der Aktivierungsschleife (DFG-Motiv, nach Liu et al.).[127]

1.3.2 Elektrophile Gruppen für die Entwicklung kovalenter Inhibitoren

Für das Design von kovalent-bindenden Inhibitoren sind eine Reihe von elektrophilen Gruppen in der Literatur beschrieben und für die Bindung an Cystein- und Lysin-Reste von Kinasen angewendet worden. Die am häufigsten angewandte Reaktion ist die Michael-Addition, die durch Acrylamide, Vinylsulfone, Chinone oder Propargylsäure-Derivate eingegangen wird (Abbildung 17).[121, 126-127] Dabei ist die Modifikation in der Regel irreversibel. Einzig durch α-Cyanoacrylate kann eine reversible Inhibition von Kinasen erfolgen.[135] Eine nukleophile Substitution findet typischerweise unter Freisetzung eines Halogenid-Ions statt, wobei auch einzelne Arbeiten mit Verwendung von α-Diazocarbonylen zur Inhibition von Pepsin-Proteasen beschrieben sind.[136] Die nukleophile Addition wird in der Regel für die kovalente Inhibition von Proteasen angewendet. Für Phenylboronsäure-Derivate wurde jedoch auch die Inhibition der VEGFR2-Kinase beschrieben. Proteasen haben katalytisch aktive Serin-, Threonin- oder Cystein-Reste, die aufgrund ihrer Lage im aktiven Zentrum eine höhere Reaktivität haben als nicht-katalytisch aktive Reste. Somit können auch die weniger reaktiven Aldehyde, Ketoamide und Nitrile kovalent binden.[129] Bis heute sind keine Ansätze beschrieben, die auf eine kovalente Bindung eines Kinase-Inhibitors an einen Serin- oder Threonin-Rest abzielen.

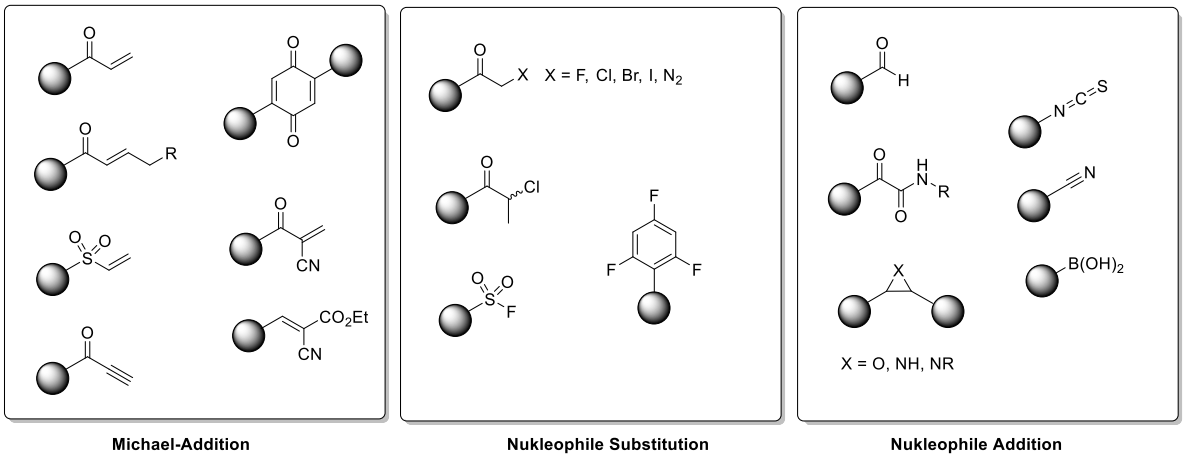


Abbildung 17. Struktur verschiedener elektrophiler Gruppen, die eine Michael-Addition, nukleophile Substitution oder nukleophile Addition eingehen.

1.3.3 Therapeutisch zugelassene kovalent bindende Kinase-Inhibitoren

Afatinib (Gilotrif®) ist ein seit 2013 zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) zugelassener, kovalent-bindender Inhibitor des EGF- und des Her2-Rezeptors (Abbildung 18). Zusätzlich wird er auch in klinischen Studien zur Behandlung anderer solider Tumore, wie Brustkrebs untersucht.[137] Dabei ist die Verwendung auf EGFR-mutierte Tumore eingegrenzt. Die Acrylamid-Gruppe von **Afatinib** geht eine Michael-Addition mit Cys797 am *C*-terminalen Ende der *Hinge*-Region in EGFR ein und ist damit, im Gegensatz zu zugelassenen EGFR-Inhibitoren der ersten Generation wie **Erlotinib** und **Gefitinib**, auch gegenüber der *Gatekeeper*-Mutation T790M aktiv.[138]

Neratinib (Nerlynx®) ist seit 2017 in den USA als adjuvante Therapie bei Her2-positivem Brustkrebs im frühen Stadium nach Behandlung mit dem Her2-Antikörper **Trastuzumab** zugelassen.[139] Der Wirkmechanismus ist ähnlich zu **Afatinib**, jedoch besetzt die 2-Pyridylgruppe von **Neratinib** die regulatorische Tasche. Eine Zulassung in Europa ist Mitte 2018 für die gleiche Indikation erteilt worden.

Ibrutinib (Imbruvica®) ist ein irreversibler Inhibitor der Brutons-Tyrosinkinase (BTK) und ist zur Behandlung von B-Zell-Neoplasien wie dem Mantelzelllymphom (2013), der CLL (2014) und Morbus Waldenström (2015) zugelassen.[140]

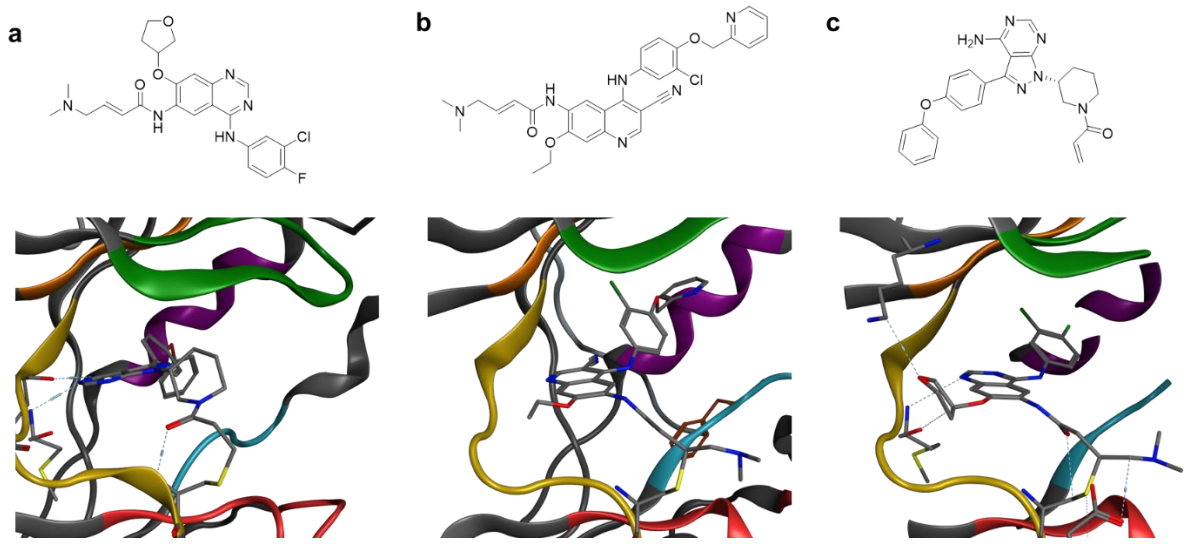


Abbildung 18. Strukturen und Bindungskomplexe zugelassener, irreversibler Kinase-Inhibitoren mit den Zielkinasen. (a) **Afatinib;**[141] (b) **Neratinib;**[142] (c) **Ibrutinib**.[143]

1.4 Inhibition von FLT3 zur Therapie der AML

Die FMS-ähnliche Tyrosinkinase 3 (*FMS-like tyrosine kinase* 3, FLT3, auch CD135) ist eine Rezeptortyrosin-Kinase der PDGF-Rezeptorfamilie (III) und wird von dem FLT3-Gen kodiert. FLT3 ist der Rezeptor für das Zytokin FLT3-Ligand (FLT3L). Er wird auf den Oberflächen verschiedener lymphatischer und myeloider hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark exprimiert und ist entscheidend für die normale Entwicklung der Vorläuferzellen und reguliert Zellüberleben, -apoptose und -differenzierung. Die verwandte Kinase FMS wurde erstmals als Onkogen für das *Feline McDonough Sarcoma* (FMS bzw. CSF1-R) beschrieben.[144]
Wie bereits beschrieben ist *flt3* das am häufigsten in der AML mutierte Gen und führt zu einer besonders schlechten Prognose der Patienten. Zusätzlich sind auch Wildtyp-überexprimierende Fälle der AML beschrieben, die ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.

1.4.1 Aufbau und Regulation der FLT3

FLT3 besteht, wie alle Rezeptoren der TK-Typ-III-Familie, aus fünf extrazellulären, Immunoglobin-G-ähnlichen Domänen (IGL), einer extrazellulären Domäne, einer Transmembran-Domäne (TM), einer Juxtamembran-Domäne (JM) und der Kinase-Domäne (Abbildung 19). Die Kinase-Einheit besteht aus zwei Teilen, die über ein Kinase-Insert, die *Hinge*-Region, miteinander verbunden sind. Zytoplasmatisches FLT3 kann glykosyliert werden, wodurch die Lokalisation auf der Zelloberfläche erhöht wird.[145]

Nach Bindung von zwei FLT3-Rezeptoren mit dem FLT3L bildet sich ein ternärer Komplex, der die intrazellulären Kinase-Domänen so zueinander bringt, dass sich diese gegenseitig phosphorylieren. Dadurch wird die Kinase phosphoryliert und aktiviert nachgeschaltete Signalproteine. Diese gehören zu verschiedenen intrazellulären Signalwegen, wie der STAT5-, MAPK-, PI3K- und AKT-Signalwege. Außerdem wird auch eine Unterdrückung anti-apoptotischer FOXO31-Expression beobachtet. Aktivierung von STAT5 führt zu genomischer Instabilität durch die Erzeugung von

reaktiven Sauerstoffspezies und DNA-Doppelstrangbrüchen. STAT5 ist im Gegensatz zur mutierten Form kein Substrat für die Wildtyp-Form.[146]

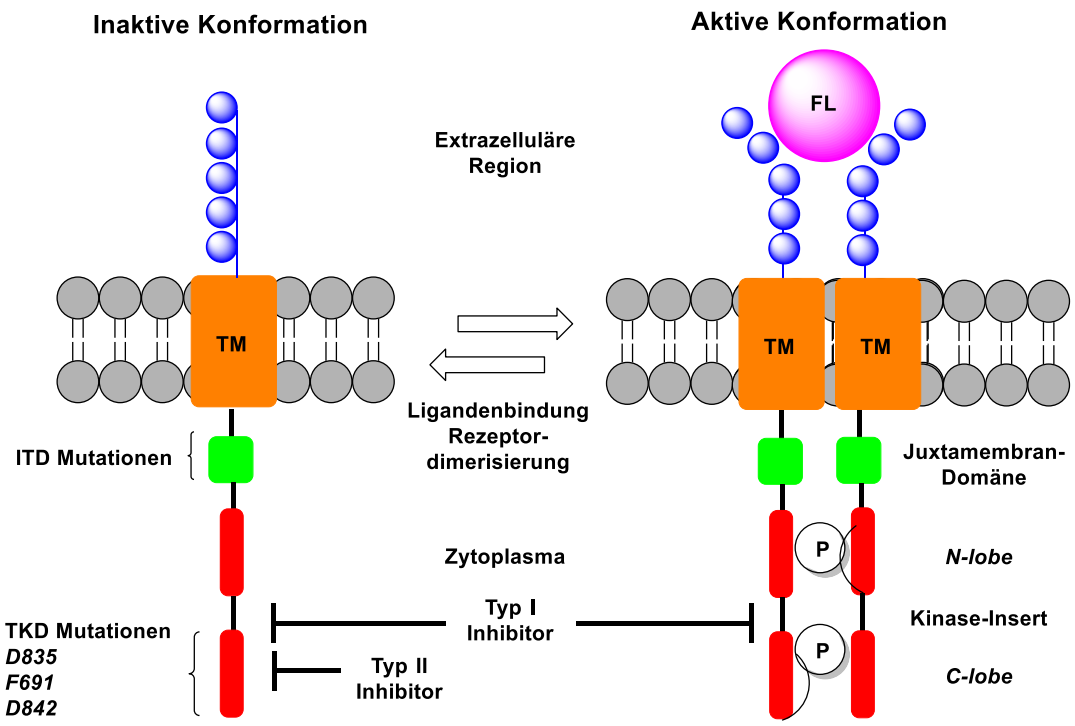


Abbildung 19. Aufbau der FLT3 und Regulierung durch Rezeptor-Dimerisierung.

1.4.2 FLT3 als Proto-Onkogen

Mutationen der FLT3 treten typischerweise in der regulierenden JM-Domäne oder in der Kinase-Domäne auf. In der JM-Domäne werden häufig interne Tandemduplikationen (ITD) mit *in-frame* Duplikationen unterschiedlicher Basenlänge beobachtet, die mit der Entwicklung der AML assoziiert sind. Diese können zwischen 3 und mehr als 400 Basenpaare lang sein. Mutationen in der JM erlauben Liganden-unabhängige Homodimerisierung von FLT3 und resultieren somit in Liganden-unabhängiger, konstitutiver Aktivierung.[147]

FLT3(ITD)-Mutationen wurden erstmals 1996 in Zellen von AML-Patienten nachgewiesen. Später konnten Punktmutationen im Codon, das für die Aminosäure D835 kodiert, nachgewiesen werden (Tyrosinkinase-Domäne-Mutation, TKD).

Insgesamt liegen in 20 bis 30% der Patienten mit AML eine ITD-Mutation, in 5 bis 10% eine TKD-Punktmutation vor.[148]

Die Einführung der FLT3(ITD)-Mutation in den FLT3wt DNA-Lokus führten in einem Mausmodell zu Splenomegalie, einer Leukozytose und einer Expansion von myeloiden Zellen. Dies sind typische Charakteristika einer myeloproliferativen Erkrankung, also eines AML-Vorläufers, wobei nicht die Stärke einer AML erreicht wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass zusätzliche Mutationen vorliegen müssen, um eine AML zu entwickeln.[149]

1.4.3 Übersicht der FLT3 Kinase-Inhibitoren in klinischer Entwicklung

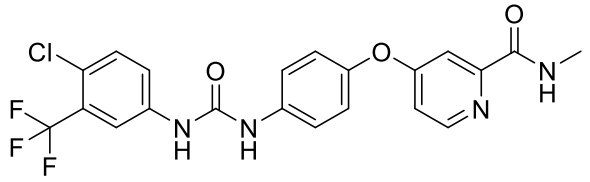
Die zurzeit in klinischer Entwicklung befindlichen FLT3-Inhibitoren wirken in der Regel kompetitiv in der ATP-Bindungstasche. Zusätzlich befinden sich Wirkstoffe in präklinischer Entwicklung, die nicht als TKI wirken. Dazu gehören Antikörper gegen die IgG1-Domäne von FLT3[150] und chimäre CAR-T-Zell Antikörper.[151]

Inhibitoren der ersten Generation werden im Folgenden vorgestellt. Sie wirken recht unselektiv, da sie nicht für FLT3 entwickelt wurden, zeigen aber trotzdem eine gute Inhibition, weshalb sie in klinischen Studien untersucht wurden.

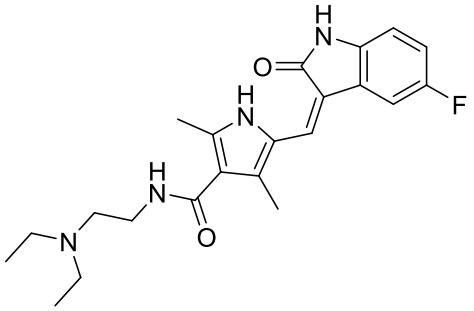
Sorafenib (Bayer) ist ein Multikinase-Inhibitor, der verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen wie KIT, PDGFRα/β, VEGFR2, RET und FLT3 (IC_{50} = 58 nM) inhibiert (Abbildung 20).[152] **Sorafenib** führte als Monotherapie in Phase 1-Studien nur zu transienten Reduktionen der Blastenzahl. In einer Phase 3-Studie mit älteren Patienten konnte nach Behandlung mit **Sorafenib** im Anschluss an konventionelle Chemotherapie Remissionen beobachtet werden, die jedoch nicht zu einer längeren Gesamtüberlebenszeit führten. In Phase 2-Studien in jüngeren Patienten konnte ein verlängertes krankheitsfreies Überleben beobachtet werden, das jedoch nicht zu einem verlängerten Gesamtüberleben führte.[153-154]

Sunitinib (Pfizer) ist ein Indolinon-Derivat und ist unter anderem zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms zugelassen.[155] **Sunitinib** inhibiert die Kinasen cKIT, VEGFR2 und

PDGFRα/β stärker als FLT3.[156] In einer Phase 1-Studie mit 15 Patienten mit fortgeschrittener AML konnte in sieben Patienten eine vorläufige Reduktion der peripheren Blasten beobachtet werden. Die Studie wurde jedoch eingestellt, nachdem zwei Patienten an Kardiotoxizität starben, woraufhin auch die klinische Entwicklung von **Sunitinib** eingestellt wurde.[157-158]



Sorafenib

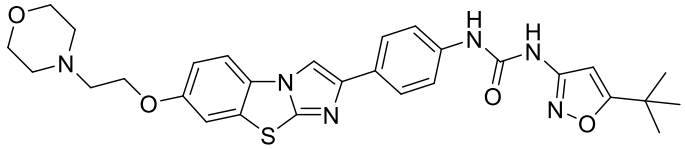


Sunitinib

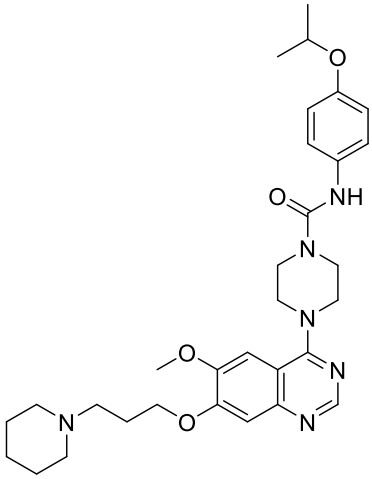
Abbildung 20. Struktur der Multikinase-Inhibitoren **Sunitinib** und **Sorafenib**, die in AML untersucht wurden und bei anderen Indikationen zugelassen sind.

Quizartinib (Ambit Biosciences) ist ursprünglich für die Inhibition der FLT3-Kinase entwickelt worden und zeigt eine hohe Selektivität und starke Inhibition gegenüber der FLT3-ITD-Mutation (IC_{50} = 1.1 nM, Abbildung 21).[159] Im Jahr 2015 wurde eine Kokristallstruktur mit FLT3 veröffentlicht, die den Bindungsmodus aufklären konnte. Der Isoxazol-Ring ist in der regulatorischen Tasche platziert, während das Harnstoff-Motiv Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den Hauptkettenatomen der Aktivierungs-schleife eingeht. **Quizartinib** hat jedoch aufgrund dieses Typ II-Bindungsmodus nur eingeschränkte Wirkung gegenüber Mutationen der Kinase-Domäne, welche das Gleichgewicht zur aktiven, DFG-*in* α-C-Helix-*in* Konformation verschieben. Präklinische Studien haben eine hohe Bioverfügbarkeit gezeigt. In einer Phase 1-Studie konnte eine Dosis-limitierende Kardiotoxizität festgestellt werden. Von 18 Patienten mit einer FLT3(ITD)-Mutation konnte eine komplette Remission und vier partielle Remissionen beobachtet werden. In einer Phase 2-Studie konnte in 50% der Patienten mit refraktärer oder rezidivierter AML ein Ansprechen beobachtet werden. Aufgrund der Knochenmarksuppression konnte jedoch keine vollständige hämatologische Remission erreicht werden.[160]

Das Chinazolin-Derivat **Tandutinib** (Millenium) inhibiert die FLT3(ITD), aber nicht die TKD-Mutationen. Es inhibiert auch PDGFRβ und cKIT, ist ansonsten aber selektiv gegenüber FLT3. In einer Phase 1-Studie mit 40 Patienten mit refraktärer oder rezidivierter AML konnte jedoch bei nur drei Patienten eine Verringerung der Blastenzahl im Knochenmark festgestellt werden, da das maximale Plasmalevel der Substanz unterhalb des biologisch notwendigen lag. In einer Phase 2-Studie mit FLT3(ITD)-positiven AML Patienten konnte nur in einem Teil der Patienten ein klinisches Ansprechen beobachtet werden, weshalb die Entwicklung dieser Substanz nicht weiter verfolgt wird. Ein Grund für das Scheitern ist die im Vergleich zu **Sorafenib** und **Quizartinib** deutlich geringe Effektivität gegen FLT3(ITD) (IC_{50} = 220 nM).[161]



Quizartinib



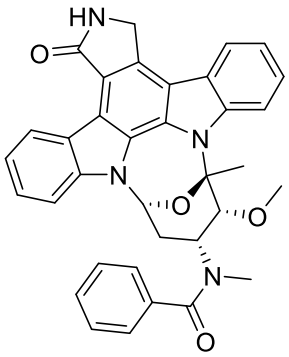
Tandutinib

Abbildung 21. Struktur der selektiven Typ II-Inhibitoren **Quizartinib** und **Tandutinib**.

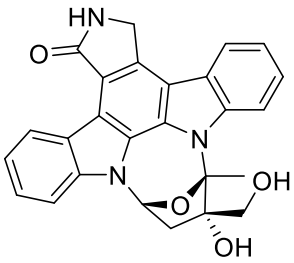
Staurosporin ist ein Naturstoff und ebenfalls ein potenter Inhibitor von FLT3, aber unselektiv gegenüber anderen Kinasen-Gruppen. Das seit 2017 zur Behandlung der AML zugelassene **Midostaurin** (IC_{50} < 10 nM) ist das *N*-Benzyl-Derivat des Staurosporins und wurde ursprünglich als VEGFR2-Inhibitor entwickelt. Es ist seit April 2017 in den USA zur Behandlung neu diagnostizierter AML mit FLT3-Mutationen zugelassen. Midostaurin inhibiert sowohl die ITD- als auch die TKD-Mutanten. In einer Phase 2-Studie mit AML-Patienten konnte über alle Patientengruppen bei der Hälfte der Patienten eine 50%ige Reduktion der Blasten im Knochenmark beobachtet werden, wobei jedoch nur ein Patient eine vollständige Remission erzielte und die

Ansprechdauer gering war. Deshalb wurde in der randomisierten RATIFY Phase-3-Studie **Midostaurin** nicht als Monotherapie, sondern in Kombination mit Chemotherapie in der Induktions- und Konsolidationstherapie bei FLT3(ITD) oder TKD-Mutationen evaluiert. Hierbei konnte bei mit **Midostaurin** behandelten Patienten eine Erhöhung des mittleren Gesamtüberlebens festgestellt werden (75 Monate mit **Midostaurin**, 26 Monate in der Kontrollgruppe). Die 4-Jahres Überlebensrate stieg jedoch nur von 44% in der Kontrollgruppe auf 51% in der **Midostaurin**-Gruppe.[162]

Lestaurtinib (Cephalon, IC_{50} = 3 nM) ist ebenfalls ein Indolocarbazol-Derivat und ist eng mit **Midostaurin** und **Staurosporin** verwandt. Es zeigt ähnliche Selektivitäten, inhibiert aber auch JAK2. In einer Phase 2a-Studie mit 12 Patienten mit FLT3-Mutationen konnte in 4 Patienten eine partielle Remission erreicht werden, wobei keine kompletten Remissionen beobachtet wurden. Aufgrund der geringen Plasmakonzentration wurde ebenfalls die Kombination mit konventioneller Chemotherapie in einer Phase 2- und einer Phase 3-Studie untersucht. Hierbei zeigte sich zu der nur mit Chemotherapie behandelten Kontrollgruppe keine erhöhte Rate an kompletten Remissionen, weshalb die Entwicklung eingestellt wurde. In einer Korrelationsanalyse konnte jedoch eine erhöhte Gesamtüberlebensrate in Patienten gezeigt werden, bei denen die FLT3-Aktivität mit mindestens 85% inhibiert wurde. Im Gegensatz zu **Midostaurin** wurde jedoch die Erhaltungstherapie nicht kombiniert.



Midostaurin



Lestaurtinib

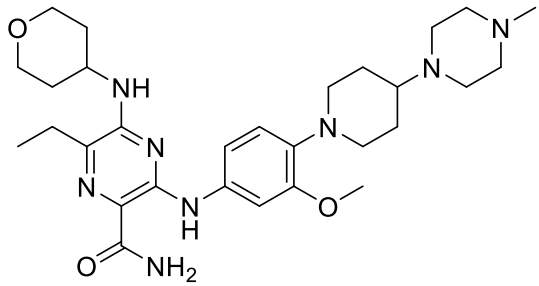
Abbildung 22. Struktur der **Staurosporin**-Analoga **Midostaurin** und **Lestaurtinib** (Typ I-Inhibitoren der ersten Generation).

Der geringe Erfolg der FLT3-Inhibitoren der ersten Generation lässt sich sowohl auf Dosis-limitierende Nebenwirkungen und geringe Plasmakonzentrationen zurückführen. Diese Wirkstoffe waren nicht zielgerichtet für die Inhibition der FLT3 entwickelt

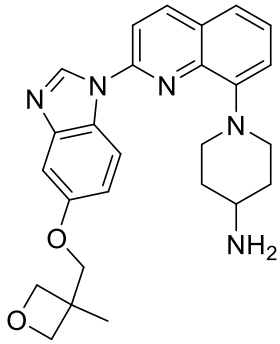
worden und haben deshalb keine optimale Affinität und Selektivität gegenüber FLT3-Mutationen gezeigt. Deshalb wurde aufbauend auf den Erfahrungen dieser Inhibitoren der „ersten Generation“ neue Inhibitoren der „zweiten Generation“ entwickelt.

Gilteritinib (ASP2215, Abbildung 23) ist ein dualer FLT3-AXL-Inhibitor und ist zurzeit als Monotherapie und in Kombination mit anderen Wirkstoffen in verschiedenen Phase 3-Studien in der klinischen Entwicklung. Es wurde im November 2018 zur Behandlung FLT3-mutierter, rezidivierter oder refraktärer AML in den USA zugelassen. Dabei erfolgt die Induktionstherapie mit **Gilteritinib** in Kombination mit **Cytarabin** und **Idarubicin**, wobei vorläufige Studienergebnisse eine vollständige Remission in 83% der Patienten zeigten.[163]

Crenolanib ist ein selektiver FLT3-Inhibitor und sowohl gegen die ITD- als auch die TKD-Mutante aktiv, womit es auch bei rezidivierter AML mit zusätzlichen FLT3-Mutationen aktiv ist. Die klinische Effizienz ist deutlich höher, wenn maximal zwei Chemotherapien vor der Behandlung erfolgten.[164] Die Metabolisierung erfolgt durch Cytochrom P450 und die Halbwertszeit ist mit 8 h deutlich kürzer als die anderer TKIs, weshalb der Wirkstoff drei Mal täglich appliziert werden muss.[165] Mit Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass in Kombination mit **Cytarabin** und Anthracyclinen bei 80% der Patienten keine minimale Resterkrankung vorliegt.[166] In einer Phase I-Studie konnten 90% der Patienten mit FLT3-Mutationen eine komplette Remission erreichen.[163]



Gilteritinib



Crenolanib

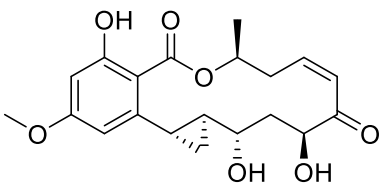
Abbildung 23. Typ I-FLT3-Inhibitoren der zweiten Generation in klinischer Entwicklung.

In der Monotherapie der FLT3(ITD)-positiven AML liegt bei nicht mit TKI-vorbehandelten Patienten eine höhere mittlere Überlebensrate vor (238 Tage) als bei vorbehandelten Patienten, die am niedrigsten bei Patienten mit dualer FLT3(ITD) und TKD-Mutation war (63 Tage).[167]

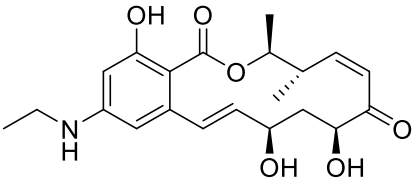
1.4.4 Irreversible FLT3-Inhibitoren

Der Naturstoff **Hypothemycin** (Abbildung 24) ist ein makrozyklisches Resorzinsäure-Lakton, das 18 verschiedene Kinasen, darunter auch FLT3, inhibiert.[168] Das cis-Enon wird durch das dem DFG-Motiv verschiedener Kinasen vorgelagerte Cystein (Cys828 in FLT3) angegriffen und addiert irreversibel. Dieses „Gruppe 4"-Cystein tritt in 48 der ca. 500 Kinasen im menschlichen Kinom auf. Die kokristallisierte Struktur von **Hypothemycin** im Komplex mit der ERK2 Kinase zeigt, dass **Hypothemycin** in der aktiven, DFG-*in* Konformation bindet, wobei der Resorzinsäure-Kern Wechselwirkungen mit der *Hinge*-Region eingeht.

E6201 (Spirita Oncology) ist ein dualer MEK1/FLT3-Inhibitor und strukturell eng mit **Hypothemycin** verwandt.[169] Es wurde in einer Phase-I/II-Studie in FLT3-mutierter AML, MDS und CMML untersucht. Die Studie wurde jedoch 2017 wegen unzureichender Aktivität während der Dosis-Findung-Phase abgebrochen (NCT02418000). Es zeigte jedoch nach intravenöser Gabe in Patienten mit soliden Tumoren Aktivität, insbesondere beim metastasierenden malignen Melanom mit Hirnmetastasen.[170] In einem Mausmodell der Dermatitis konnte gezeigt werden, dass topisch appliziertes **E6201** die Migration von Neutrophilen und Lymphozyten verhindert, wodurch eine Verwendung bei entzündlichen, aber auch hyperproliferativen Erkrankung der Haut effektiv sein kann.[171]



Hypothemycin



E6201

Abbildung 24. Struktur der bekannten, irreversibel-bindenden FLT3-Inhibitoren **Hypothemycin** und **E6201**.

1.4.5 Aufkommen von Therapie-resistenten FLT3-Mutationen

Die Therapie mit FLT3-Inhibitoren führte in klinischen Studien häufig zu Mutationen, die zu einer Resistenz gegen die ursprüngliche Therapie führten. Diese können im ursprünglichen Klon auftauchen (Mutation der zweiten Generation), indem eine Resistenz-vermittelnde Punktmutation in einem FLT3-ITD-Allel auftritt. Es sind zudem einzelne Fälle bekannt, in denen zwei Punktmutationen in demselben Allel gleichzeitig vorliegen. Primäre Resistenzen liegen vor, wenn ein Wirkstoff gegen FLT3-TKD-Mutationen wenig effektiv ist oder andere Signalwege in der Tumorzelle aktiviert werden.

Eine sekundäre, also erworbene Resistenz liegt vor, wenn Resistenz-erzeugende Mutationen oder eine Überexpression als Antwort auf die initiale Therapie resultieren oder eine Stimulierung durch den FLT3L erfolgt.

Den wichtigsten Resistenz-vermittelnden Effekt stellt jedoch der Erwerb von sekundären Mutationen in der Kinase-Domäne dar, nachdem zu Beginn der Erkrankung ausschließlich die FLT3(ITD)-Mutation vorlag. Während dieser Effekt durch die geringe Effektivität der Inhibitoren der ersten Generation nicht verstanden werden konnte, wurde 2012 durch Smith et al. erstmals die Resistenz-Bildung in der FLT(ITD) AML nach Behandlung mit **Quizartinib** nachgewiesen. Dabei konnten nach einer initialen, vollständigen Remission nach Behandlung mit **Quizartinib** als Monotherapie in acht Patienten bei Krankheitsrückfall neue Mutationen entdeckt werden. Dabei lagen Mutationen in der Aktivierungsschleife (D835Y, D835V, D835F) oder im *Gatekeeper*-Rest (F691L) vor (Abbildung 25). Durch die Einführung einer Aktivierungsschleifen-Mutation wird vermutlich die inaktive Konformation der Kinase destabilisiert, da sich durch Einführung der hydrophoben Aminosäuren kein stabilisierendes Wasserstoffbrücken-Netzwerk ausbilden kann und somit das Gleichgewicht der Kinase massiv zur aktiven, DFG-*in*-Form verschoben wird. Die Ergebnisse sind in ähnlicher Weise auch bei anderen Tyrosinkinasen zu beobachten. Dazu gehören Mutationen des *Gatekeeper*-Restes wie sie in EGFR (T790M) oder BCR-Abl (T315I),[172] aber auch in der

Aktivierungsschleife bei cKIT (D816V) und PDGFRα/β derselben TK-Familie zu beobachten sind.[173]

Der Wachstums-inhibierende Effekt durch FLT3-Inhibitoren kann außerdem durch Stimulierung mit den FLT3-Liganden verringert werden. So konnte nach Therapie mit **Lestaurtinib** eine Erhöhung der FLT3L-Konzentration im Plasma detektiert werden, wodurch die klinische Wirksamkeit verringert wurde.

Es wird davon ausgegangen, das bereits zur Diagnose der Erkrankung verschiedene Unterklone vorliegen, welche durch FLT3-gerichtete Therapie selektiert werden und nach Inhibition der FLT3(ITD) an Vorrang gewinnen. Zusätzlich konnte nach Behandlung einer FLT3-mutierten AML mit einem TKI auch eine FLT3-Unabhängigkeit der Leukämie beobachtet werden.[102]

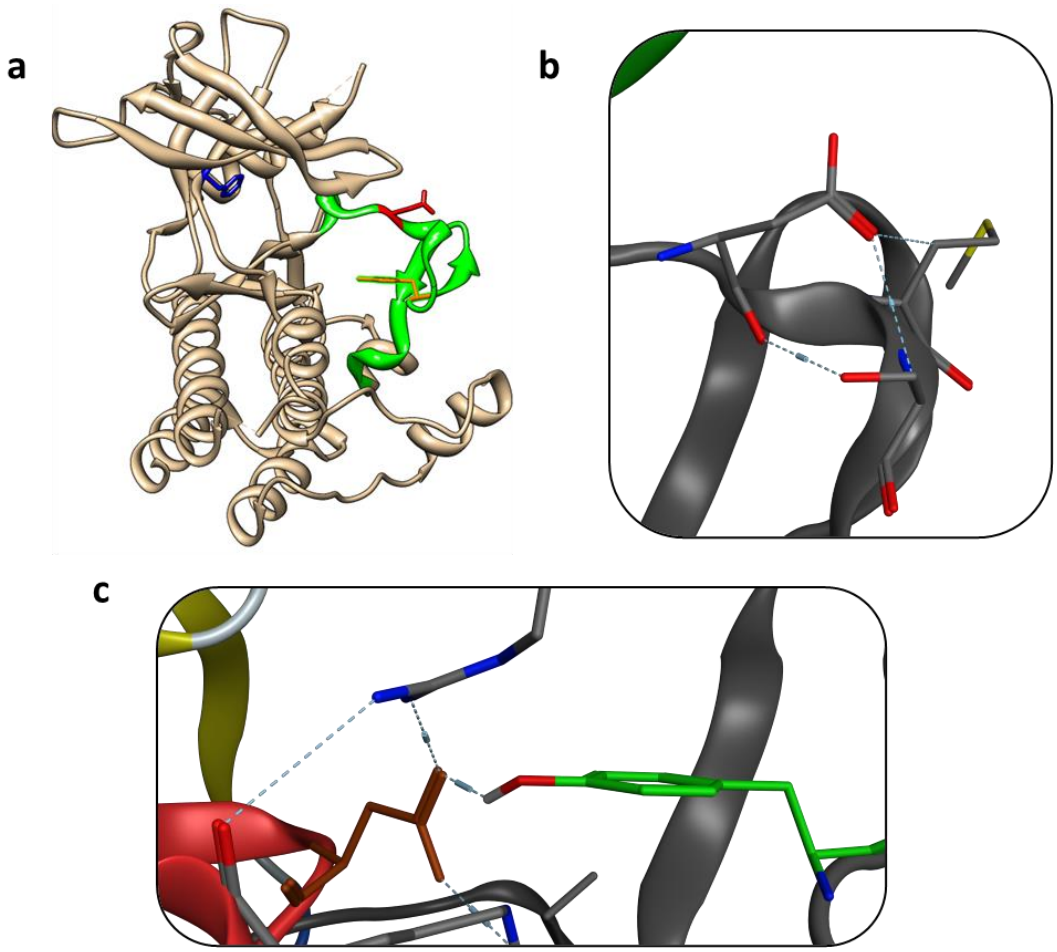


Abbildung 25. (a) In der inaktiven Form von FLT3*wt* blockiert die JM die Aktivierung der Kinase und inhibiert spontane selbst-Dimerisierung. *Gatekeeper*-Mutationen (blau) verringern die Affinität von heterozyklischen Inhibitoren und verringern *face-to-face* π-π-Wechselwirkungen. (b) Mutationen in den D835 und (c) Y842-Resten der Aktivierungsschleife destabilisieren das Wasserstoffbrückennetzwerk der inaktiven Kinasekonformation.[67]

1.5 Das Proteasom als Zielprotein in der Tumortherapie

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der wichtigste nicht-lysosomale Abbau-Weg für nicht funktionsfähige Proteine. Diese können entweder Schäden in der Faltung, der Sekundär- oder Tertiärstruktur aufweisen, chemisch modifiziert sein oder generell kurzlebig und nur zeitlich eingeschränkt aktiv sein. Eine funktionierende Protein-Homöostase, also ein Gleichgewicht aus dem Abbau fehlerhafter Proteine und der Neuexpression funktionaler Proteine ist entscheidend für die Proliferation von Zellen. Entscheidend ist ein zügiger Abbau nicht-funktionaler Proteine aus mehreren Gründen. Zum einen wird die Aktivierung verschiedener Signalwege durch die Menge an Proteinliganden reguliert, zum anderen werden die freigesetzten Peptide durch nachgeschaltete Peptidasen zu freien Aminosäuren gespalten, die wiederum als Bausteine für die *de novo* Synthese von Proteinen benötigt werden.[174]

Die Markierung von Proteinen erfolgt durch eine dreistufige Enzymkaskade. Das Signalprotein Ubiquitin wird hierbei zunächst durch das Enzym E1 aktiviert und auf das Ubiquitin-konjugierende E2-Protein übertragen. Anschließend wird die eigentliche Ubiquitinylierung durch die für jedes Proteinsubstrat spezifische Ubiquitin-Ligase E3 durchgeführt und der Prozess wiederholt, wodurch eine Markierung durch Polyubiquitinketten erfolgt. Die zentrale katalytische Einheit des UPS ist das zylinderförmige 26S-Proteasom (Abbildung 26a).[175] Dieses besteht aus zwei regulatorischen 19S Einheiten, die den Zugang von markierten Proteinen zum 20S Kernpartikel ermöglichen, der für die Proteolyse verantwortlich ist. Dieser besteht aus vier heptameren Ringen, die jeweils aus α- oder β-Untereinheiten aufgebaut sind (α1-7, β1-7), wobei die beiden äußeren Ringe aus α- und die beiden inneren Ringe aus β-Untereinheiten aufgebaut sind. In den proteolytisch aktiven β-Ringen sind die Untereinheiten β1, β2 und β5 katalytisch aktiv. Gemeinhin wird die Aktivität der β1-Untereinheit als Caspase-ähnlich, die β2-Untereinheit als Trypsin-ähnlich und die β5-Untereinheit als Chymotrypsin-ähnlich bezeichnet. Die Bezeichnung orientiert sich an der Proteolyse-Präferenz der Untereinheiten; so spaltet die β1-Untereinheit ein markiertes Peptid nach einer sauren Aminosäure (Glu, Asp), die β2-Untereinheit nach einer basischen Aminosäure (Lys, Arg) und die β5-Untereinheit nach einer großen, hydrophoben Aminosäure (Leu, Phe), wobei diese Einteilung im Rahmen dieser

Dissertation detaillierter untersucht wurde. Von den Substrat-Spezifitäten abgeleitete, künstliche Substrate erlauben die Einschätzung der Inhibition der jeweiligen Untereinheit (Abbildung 26b). Die Untereinheiten, die im humanen, konstitutiven Proteasom vorliegen, werden auch als β1c, β2c und β5c bezeichnet, da sich die Sequenz und auch die Proteolyse-Spezifität in verschiedenen Unterarten des Proteasoms unterscheidet; beispielsweise in einem anderen Organismus oder einer bestimmten Zellart.

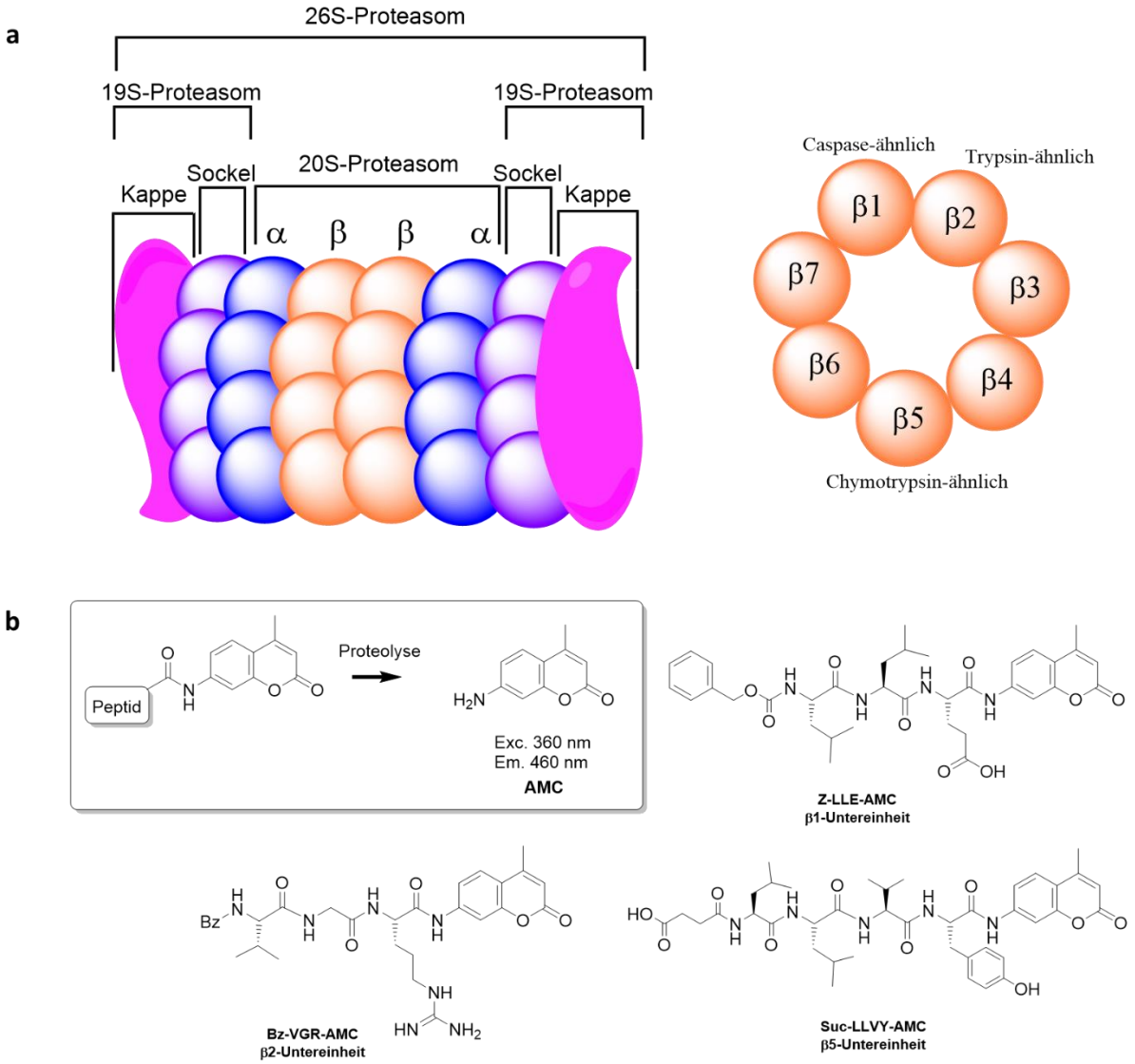


Abbildung 26. (a) Aufbau des 26S-Proteasoms und Substratpräferenzen der katalytischen Untereinheiten. (b) Umsetzung von künstlichen Substratpeptiden unter Freisetzung von AMC und Struktur der etablierten Substratpeptide für die Bestimmung der Aktivität der β1-, β2- und β5-Untereinheit.

Eine weitere wichtige Funktion des Proteasoms ist die Bildung von Antigenen. So führt die Exposition von Zellen mit dem Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α) oder dem

Interferon-γ (IFN-γ) zum Austausch der katalytisch aktiven Untereinheiten im konstitutiven Proteasom (cCP) zur β1i- (LMP2), der β2i- (MECL-1) und der β5i-Untereinheit (LMP7), wobei das Immunoproteasom entsteht (iCP). Während die Sequenz zum größten Teil konserviert ist, führen Änderungen insbesondere in der *2nd Shell* des Proteins zu leicht veränderter Substrat- und somit auch Inhibitor-Spezifität. Die Inhibition des UPS führt zu einem Ungleichgewicht zwischen nicht umgesetzten, ubiquitinylierten Substraten des Proteasoms und der verfügbaren Kapazität, wodurch Apoptose ausgelöst werden kann. Zusätzlich wird durch zu geringen Abbau des Inhibitor-Proteins für den Nekrosefaktor NFκB, IκB, der NFκB Signalweg blockiert, wodurch die nukleare Translokation des Faktors verhindert wird und somit das Überleben der Zelle gesteigert wird.[176]

1.5.1 Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren

Die vielfältigen Anstrengungen auf dem Feld der Proteasom-Inhibitoren haben bisher zur Zulassung von drei Inhibitoren zur Behandlung verschiedener, nicht-solider Neoplasien geführt. Alle Wirkstoffe verfügen dabei über eine elektrophile Gruppe, die das nukleophile, katalytische Thr1O$^{\gamma}$ in der β5-Untereinheit angreift. Die Selektivität und Bindungsstärke wird dabei durch die Aminosäuren-Seitenkette in P1 bis P4 gesteuert, die die Spezifitätstaschen S1 bis S4 besetzen, und erlaubt die Variation der Selektivität zwischen verschiedenen Protease-Familien, aber auch gegenüber einzelnen Proteasom-Untereinheiten und Isoformen (Abbildung 27).

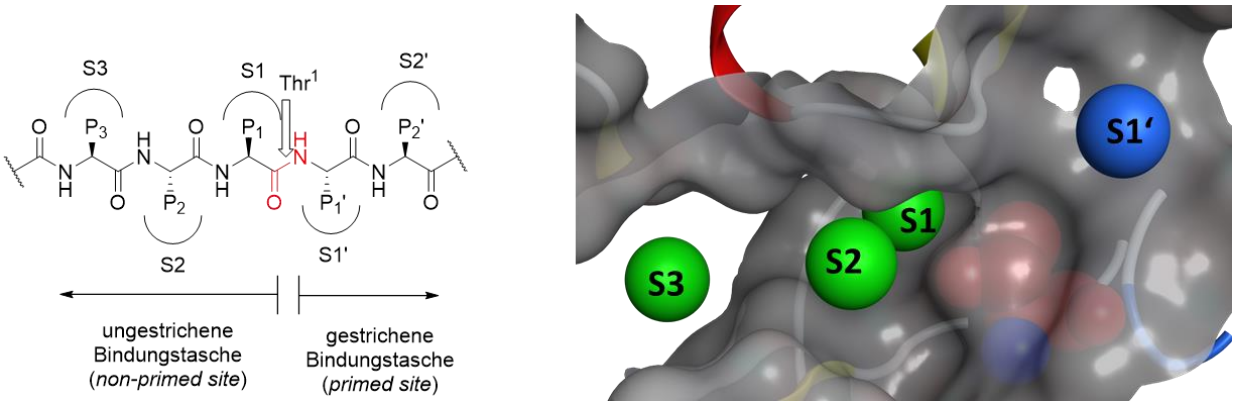
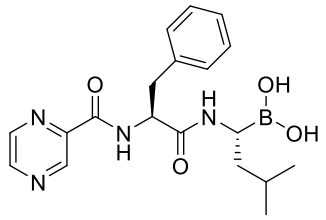


Abbildung 27. Nomenklatur von Protease-Spezifitäts-Taschen in der ungestrichenen (S1, S2, S3, ...) und der gestrichenen Bindungstasche (S1', S2', ...) und Position der Taschen in der β5-Untereinheit des Proteasoms. Der katalytisch aktive Threonin-Rest ist in Rot dargestellt.

Dabei werden typischerweise Bindetaschen in der *N*-seitigen, ungestrichenen Bindungstasche besetzt. Es sind erst wenige Inhibitoren bekannt, die eine Tasche in der gestrichenen Seite des Bindungskanals besetzen. Im Allgemeinen muss die Inhibition des Proteasoms nach der Art des Proteasoms (iCP, cCP, yCP, tCP), und damit der Zusammensetzung der Untereinheit klassifiziert (beispielsweise β5i, β5c) werden. Weiterhin gilt es, die Wirkung des Inhibitors zu unterscheiden; also ihn als reversibel oder irreversibel und als kovalent oder nicht-kovalent zu charakterisieren. Eine weitere Klassifizierung wird anhand der Struktur des Inhibitors getroffen. Während die ersten Inhibitoren des CPs peptidische Inhibitoren waren, sind neuere Ansätze nicht-peptidisch oder peptidomimetisch. Zusätzlich sind im Verlauf der Erforschung des Proteasoms einige Naturstoffe identifiziert worden, die wiederum Besonderheiten aufweisen. Neben den zugelassenen Wirkstoffen halten weitere elektrophile Kopfgruppen Einzug in die Erforschung und klinische Entwicklung im Kampf gegen maligne Neoplasien.

Im Jahr 2003 wurde von der amerikanischen FDA mit **Bortezomib** (Velcade®, Abbildung 28) der erste Inhibitor des Proteasoms zur Behandlung des Multiplen Myeloms, zugelassen. Bei **Bortezomib** handelt es sich um einen kovalent bindenden, aber langsam-reversiblen Inhibitor der β5-, aber auch der β2- und β1-Untereinheiten sowohl des Immuno- als auch des konstitutiven Proteasoms. Durch Bildung des tetraedrischen Boronat-Anions wird zum einen die katalytische Tasche ausgefüllt, wobei ein Sauerstoff des Boronats in das Oxyanionen-Loch bindet und somit ein stabiles Produkt erzeugt, das durch die Protease nicht hydrolysiert werden kann und somit die Dissoziation des Inhibitors aus der Tasche von der Stabilität der elektrophilen Kopfgruppe gesteuert wird.
Ein Problem in der klinischen Anwendung dieses Wirkstoffes ist seine recht geringe Selektivität gegenüber anderen Proteasen, zum Beispiel den Cathepsinen A und G und der Serin-Protease HtrA2/Omi, die im mikromolaren Bereich inhibiert werden. Dies führt in der klinischen Anwendung häufig zu Dosis-limitierenden Nebenwirkungen und zum Abbruch der Therapie. Eine häufige Nebenwirkung ist die Ausbildung einer peripheren Neuropathie in 30% bis 39% der Patienten. Dabei kommt es zur, in der Regel reversiblen, Schädigung von Nervenzellen, die sowohl Motorneuronen als auch sensorische Neuronen betrifft und beispielsweise zu Lähmungserscheinungen und Taubheit führen kann und entsprechend eine schwere Belastung für Patienten darstellt.



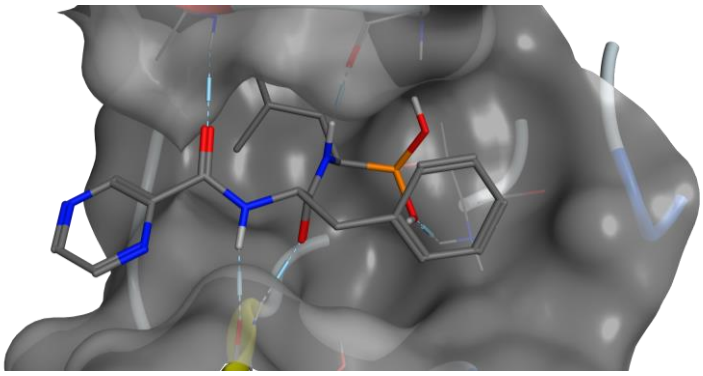
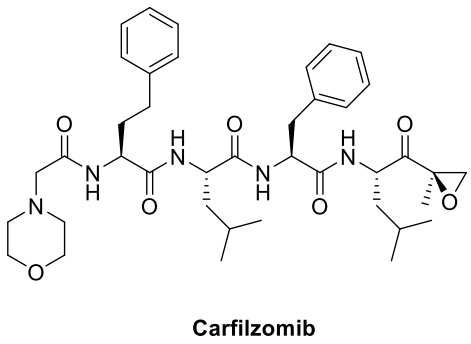


Abbildung 28. Struktur von **Bortezomib** und Bindungskomplex in der β5-Bindetasche des humanen, konstitutiven Proteasoms (PDB: 5LF3).[177]

Im Jahr 2012 wurde mit **Carfilzomib** (Kyprolis®) ein zweiter, und im Gegensatz zu **Bortezomib**, irreversibel bindender Proteasom-Inhibitor zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen, der die β5-Untereinheit des Proteasoms selektiv bindet (Abbildung 29).[178] Dabei ist die Behandlung auf Patienten beschränkt, die mit **Bortezomib** und Immunmodulatoren behandelt wurden. **Carfilzomib** wurde basierend auf dem analogen Naturstoff **Epoxomycin** entwickelt, der in den 1990er Jahren entdeckt wurde.[179] **Carfilzomib** ist deutlich potenter und selektiver als **Bortezomib** und bindet ebenfalls kovalent an das katalytisch aktive Thr1. Jedoch erfolgt mit der freien, *N*-terminalen Amin-Gruppe eine Zyklisierung unter Bildung eines Morpholin-Rings.[180]



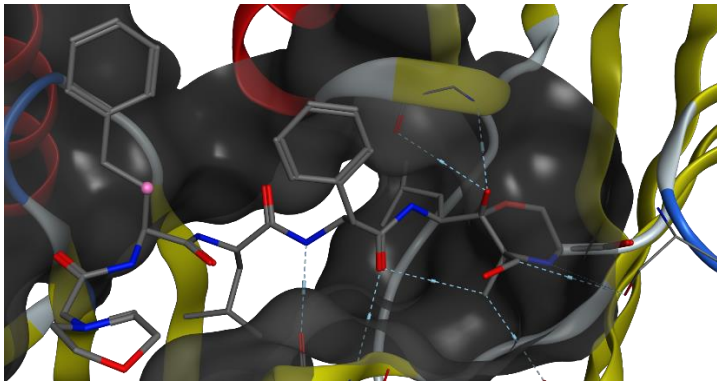


Abbildung 29. Struktur von **Carfilzomib** und Bindungskomplex in der β5-Bindetasche des humanen, konstitutiven Proteasoms (PDB: 4R67).[180]

Dazu geht der Epoxyketon-*Warhead* eine sukzessive, zweistufige Addition mit Thr1 ein. Zuerst erfolgt eine 1,2-Addition des Thr1O$^{\gamma}$ an den Carbonyl-Kohlenstoff des Epoxyketons, wodurch ein Halbketal-Addukt als Zwischenstufe entsteht (Abbildung 30). Das entstehende, tetraedrische Intermediat wird durch das

Oxyanionen-Loch stabilisiert, das im Wesentlichen durch das Hauptketten-Amid von Gly47 gebildet wird. Damit wird die Epoxid-Gruppe für einen nukleophilen Angriff durch das freie, *N*-terminale Amin von Thr1 an das C2-Atom platziert, wobei der finale Morpholin-Ring entsteht.

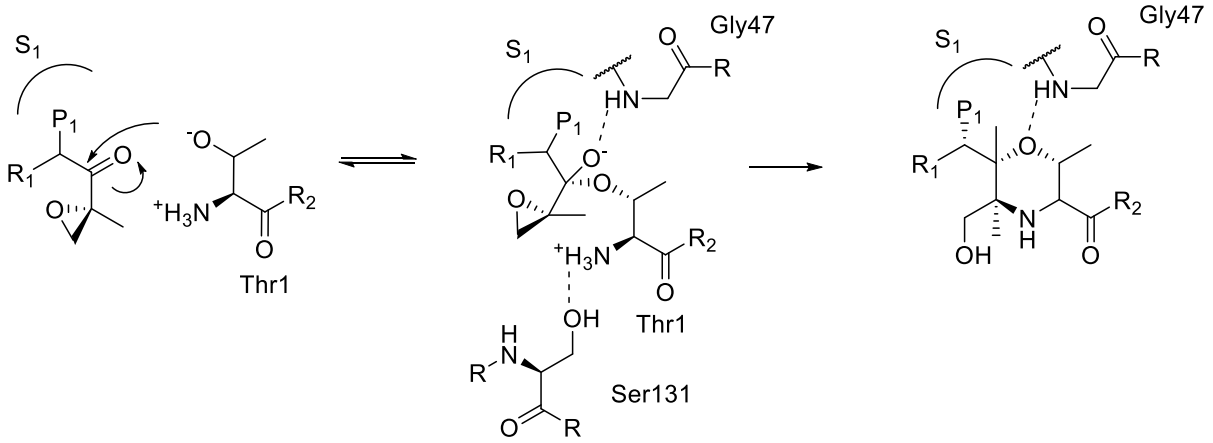


Abbildung 30. Zweistufiger Mechanismus der Zyklisierung des N-terminalen Thr1 mit dem Epoxyketon-*Warhead* in **Carfilzomib** unter Bildung eines Morpholin-Rings.

Mit **Ixazomib** (Ninlaro®, MLN2238) wurde 2015 der erste oral verfügbare Proteasom-Inhibitor in den USA zur Behandlung des multiplen Myeloms in Kombination mit Chemotherapie zugelassen.[181-182] Bei diesem handelt es sich um eine eng mit **Bortezomib** verwandte Struktur. Die Formulierung der Boronsäure als Citrat-Ester stellt ein *Prodrug*-Konzept dar, das die orale Gabe erlaubt. Der Boronsäure-Ester wird im Blutplasma und Gastrointestinaltrakt hydrolysiert und die aktive Boronsäure freigesetzt, die vom nukleophilen Thr1 in der aktiven Tasche angegriffen wird.[183] Dabei ist die Inhibition der β5- deutlich größer als die der β2- und β1-Untereinheiten. Aufgrund der zu **Bortezomib** ähnlichen Struktur gibt es auch hier *off target*-Effekte. Die Dissoziation von der β5-Untereinheit ist gegenüber Bortezomib erhöht, wodurch prinzipiell eine höhere Penetrationstiefe in Gewebe ermöglicht wird.[184]

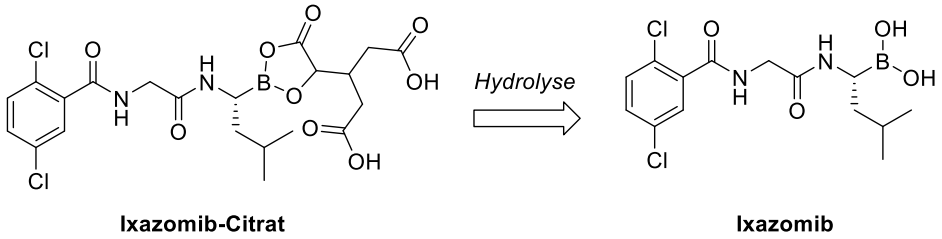


Abbildung 31. Struktur des **Ixazomib**-Citrat-Esters und des freigesetzten Wirkstoffs nach Hydrolyse.

Ein Problem von kovalent-irreversiblen Inhibitoren ist die mögliche Deaktivierung durch Glutathion oder auch ubiquitär vorkommendem Zielprotein, zum Beispiel Proteasom in den roten Blutzellen. Somit ist eine reversible Inhibierung des Proteasoms eine entscheidende Therapiealternative. Boronate scheiden hierfür aufgrund ihres ungünstigen Selektivitätsprofils und den damit zusammenhängenden Nebenwirkungen aus. Im Folgenden werden reversible Inhibitor-Klassen vorgestellt, welche alternative pharmakologische Eigenschaften aufweisen. Peptidaldehyde waren die erste große Gruppe von Proteasom-Inhibitoren und binden reversibel an die β5-, aber auch die β2- und β1-Untereinheit. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind **MG101**, **MG132** und **BSc2118** (Abbildung 32). **MG101** (Calpain-Inhibitor I) wurde ursprünglich als Inhibitor der Cystein-Proteasen Calpain I und II entwickelt und in 1992 erstmals als Inhibitor der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms beschrieben.[185-186]

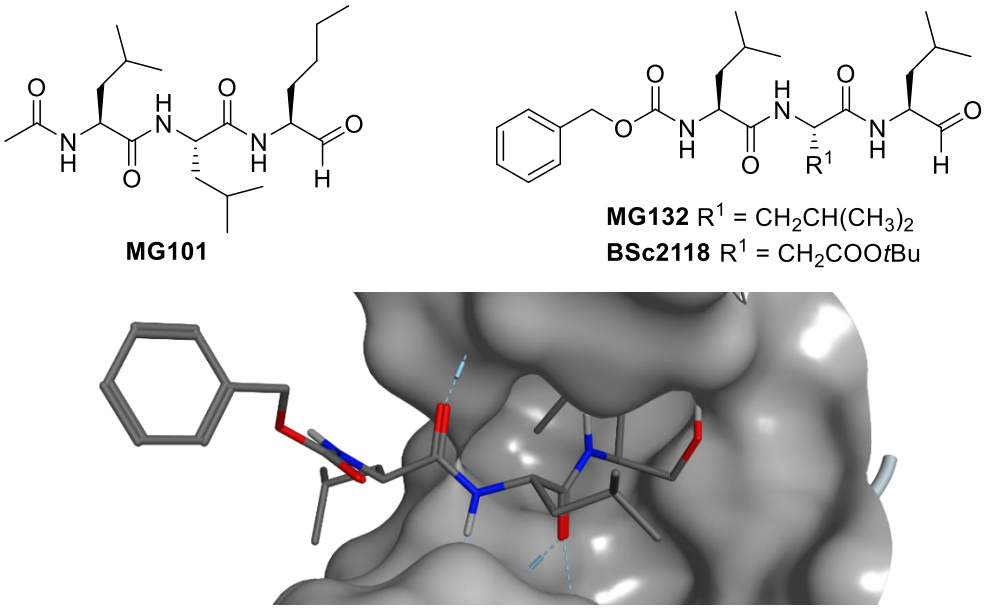


Abbildung 32. Struktur der Peptidaldehyde **MG101**, **MG132** und **BSc2118** und Bindungsmodus von **MG132** (PDB: 4NNN).[187]

In der Folge wurden **MG132** und das analoge P1-Phenylalanin-Derivat als hoch potente und selektive Inhibitoren der β5-Untereinheit beschrieben. **MG132** ist auch heute noch einer der populärsten Proteasom-Inhibitoren für mechanistische und biochemische Studien. Von Schmidt et al. konnte gezeigt werden, dass ein AspO*t*Bu-Rest in P2 die Aktivität gegenüber der β5-Untereinheit und die zytotoxischen Wirkung erhöht. Der Bindungsmodus der Peptidaldehyde ist dabei konserviert. Im Jahr 1998 wurden erstmals α-Ketoaldehyde als hoch potente und reversibel bindende, zellpermeable Proteasom-Inhibitoren beschrieben, die strukturell eng verwandt mit den Peptidaldehyden sind und nanomolare Inhibition aufweisen (Z-LLY-COCHO, Abbildung 33). Die Bestimmung des Bindungsmechanismus im Jahr 2011 durch Groll et al. zeigte einen bivalenten Bindungsmechanismus, der ähnlich zu dem der Epoxyketone ist, jedoch vollständig reversibel. Das Peptidrückgrat nimmt dabei ähnlich zu den Aldehyden eine β-Faltblattstruktur ein und wird durch die antiparallelen β-Strukturen des Proteasoms stabilisiert. Die Reste P1 bis P3 sind dabei ebenfalls in S1 bis S3 platziert. Kristallografisch konnte ein klar definierter sechs-gliedriger Ring beobachtet werden. Für die Bildung dieser Struktur wird, ähnlich zur Bildung des Morpholin-Rings mit Epoxyketonen, ein zweistufiger Mechanismus angenommen. Im ersten Schritt greift das nukleophile Thr1O$^{\gamma}$ das Keton an, wobei ein Halbketal entsteht, das durch die Lage der Hydroxylat-Gruppe im Oxyanionen-Loch über eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert ist. Im zweiten Schritt addiert das Thr1N nukleophil an die Aldehyd-Einheit, wobei nach Protonentransfer ein intermediäres Halbaminal entsteht. Durch Abspaltung von Wasser entsteht ein 5,6-Dihydro-2*H*-1,4-oxazin-Ring, der ein Halbketal und ein Imin beinhaltet. Dieser Mechanismus ist nach Addition von Wasser wiederum reversibel. Dieser spezifische Bindungsmechanismus erklärt wiederum die hohe Selektivität für die β5-Untereinheit des Proteasoms gegenüber anderen Untereinheiten und Proteasen.

Ein Problem der α-Ketoaldehyde ist jedoch die erhöhte Nukleophilie, die zur Anlagerung von Wasser führt, wodurch das weniger aktive Hydrat entsteht und Folgereaktionen wie möglichweise Decarboxylierung erfolgen können. Außerdem können Aldehyde durch Aldehydoxidasen in Carbonsäuren überführt werden, wodurch die Bioverfügbarkeit dieser Inhibitoren verringert ist.

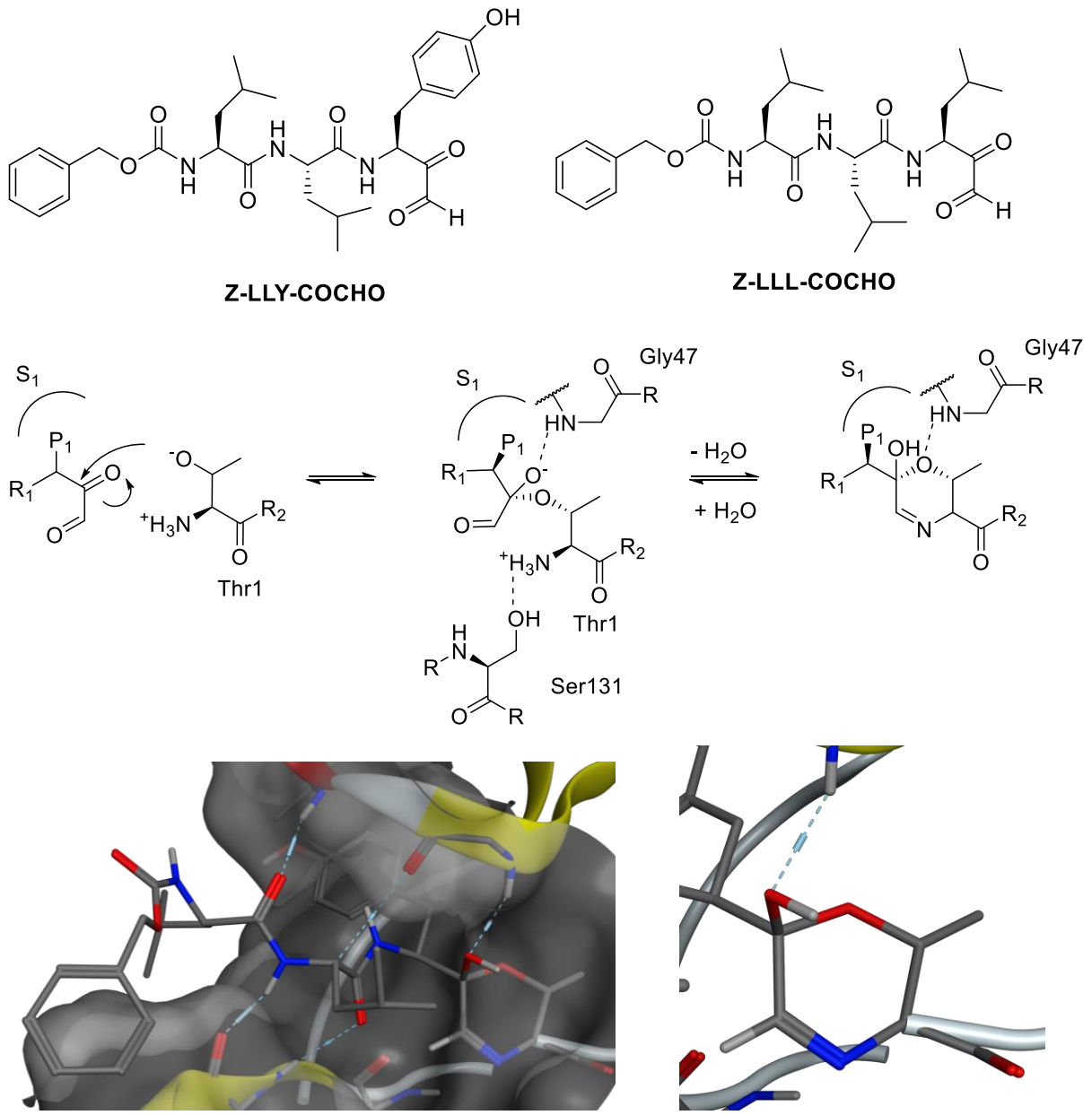


Abbildung 33. Struktur der α-Ketoaldehyde Z-LLYCOCHO und Z-LLL-COCHO und zweistufiger, reversibler Mechanismus der Zyklisierung mit dem *N*-terminalen Thr1 unter Bildung eines Oxazin-Rings (PDB: 3OKJ).[188]

Das Aldehyd-Motiv kann durch Variation zu α-Ketoamiden und α-Ketosäuren in die metabolisch stabileren Derivate überführt werden, die, im Gegensatz zu Ketoaldehyden und Epoxyketonen, jedoch keinen bivalenten Bindungsmechanismus eingehen. Phenyl-substituierte α-Ketoamide wurden 2005 von Schmidt et al. als selektive Inhibitoren der β5-Untereinheit eingeführt (**BSc2189**, Abbildung 34)[189] und deren Aktivität gegen die β5-Untereinheit im Folgenden erweitert (**BSc4999**). Der Vorteil dieses Strukturmotivs ist, dass, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Klassen, eine Verknüpfung des Inhibitors zur gestrichenen Seite des Substratbindekanals des Proteasoms möglich ist.

Somit sind neue Möglichkeiten zur Optimierung der Bindungsaffinität und Selektivität gegeben, wobei die geringere Elektrophilie des *Warheads* ausgeglichen werden kann und veränderte pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften erlaubt. Durch kristallografische Studien konnte gezeigt werden, dass diese ebenfalls Thr1 kovalent binden, die Hydroxyl-Gruppe des entstehenden Halbketals jedoch, im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Elektrophilen, entgegen des Oxyanionen-Lochs gerichtet ist (Abbildung 34). Dieses wird durch die Carbonyl-Einheit des Phenylamids besetzt und erlaubt somit eine Exposition der Phenylgruppe in die gestrichene Seite der Bindungstasche.

Ein systematischer Vergleich von elektrophilen Kopfgruppen konnte 2014 erstmals die Inhibitionsstärken verschiedener elektrophiler *Warheads* vergleichen, indem diese an ein konserviertes Z-LLL Peptidrückgrat verknüpft wurden.[187] Dabei zeigte sich, dass die Aktivität des Boronat- und des Epoxyketon-substituierten Inhibitors gegenüber der β5-Untereinheit deutlich stärker ist als die der α-Ketoamide. In HeLa-Zellen ist die zytotoxische Aktivität der Epoxyketone jedoch deutlich geringer. Aldehyde und α-Ketoaldehyde sind sowohl gegenüber dem isolierten Proteasom als auch hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität deutlich schwächer als das α-Ketoamid-Motiv.

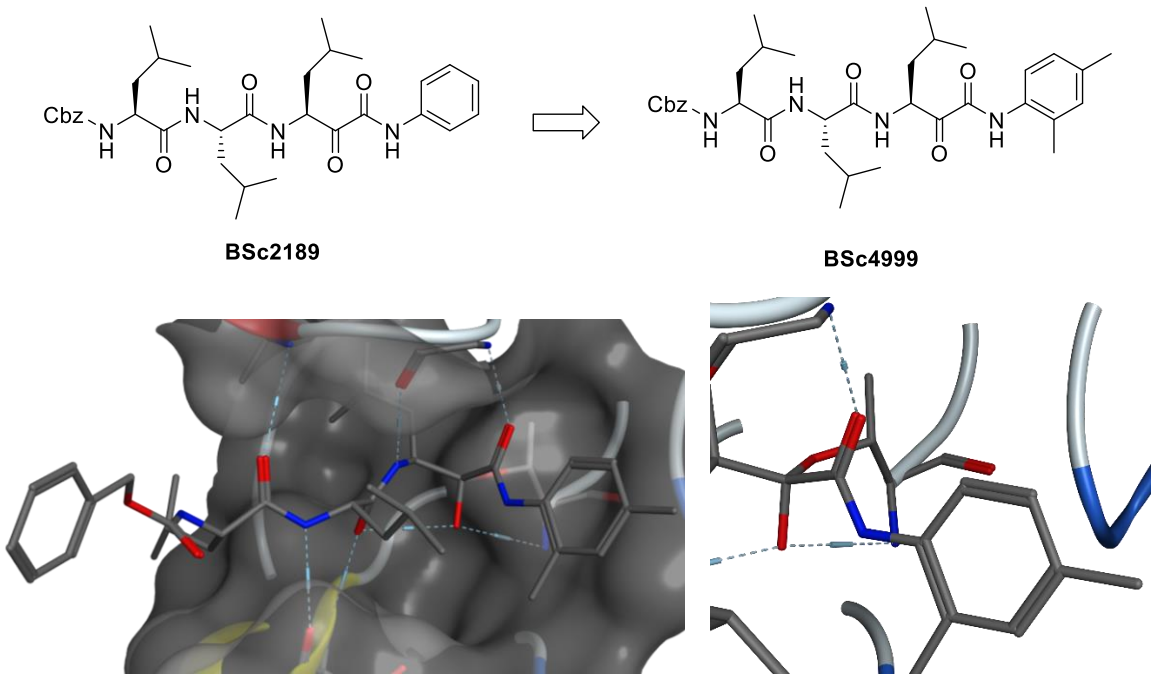


Abbildung 34. Entwicklung von Ketoamid-basierten Proteasom-Inhibitoren und Bindungsmodus in der β5-Untereinheit des Proteasoms (PDB: 4R02).[190]

1.6 Molekulare Modellierung von kovalent bindenden Inhibitoren

Mit dem aufkommenden Interesse an kovalent bindenden Kinase- und Protease-Inhibitoren in den letzten Jahren sind verschiedene Programme zur Modellierung des Bindungsmodus kovalenter Inhibitoren eingeführt worden, die die anerkannten Methoden zur Modellierung reversibel bindender Inhibitoren ergänzen.

Diese wenden unterschiedliche Strategien an, die jedoch allesamt strukturbasiert sind. Konventionelle *Scoring*-Methoden erlauben bis heute noch keine Evaluierung des Beitrags der kovalenten Bindungsbildung in einem virtuellen *Screening*. Bisher sind nur einzelne Beispiele beschrieben, welche mit zeitaufwändigen, quanten-mechanischen Kalkulationen eine gesamtheitliche Bewertung der Bindung vornehmen, weshalb in der Regel das *Scoring* der reversiblen Interaktionen zwischen Protein und Ligand und die geometrische Analyse der entstandenen Bindung zur Einschätzung verwendet wird.

AutoDock ist eine frei verfügbare Modellierungssoftware und bis heute eine der am häufigsten angewendeten.[191] Die kovalente Modellierung wird durch die sogenannte flexible Seitenketten-Methode ermöglicht. Dazu wird die reaktive Seitenkette mit dem Nukleophil verbunden und der Ligand als flexibler Rest als Teil des Rezeptors in der Energie minimiert.

CovDock ist der kovalente *Docking*-Algorithmus in der kommerziell verfügbaren *Schrödinger-Suite*.[192] Dabei können zwei Versionen angewendet werden: ein virtueller *Screening*-Modus und ein „*Pose Prediction*“ Modus, bei dem mit höherem Rechenaufwand verlässlichere Konformationen vorhergesagt werden können. Im Gegensatz zu *AutoDock* wird in *CovDock* zuerst eine reversible, nicht-kovalente *Docking*-Simulation durchgeführt, die auf dem Glide-Algorithmus basiert. Die Startkonformationen werden dann in einen Rezeptor modelliert, in dem das Nukleophil zu Alanin mutiert wurde, um einen sterischen Konflikt zwischen Protein und Ligand zu vermeiden. Dann werden nur solche *Docking*-Konformationen beibehalten, die einen Abstand von weniger als 5 Å zwischen dem elektrophilen und nukleophilen Bindungspartner zeigen und anschließend die Mutation zurück-genommen. Nach der Bindungsbildung werden dann unterschiedliche Rotamere des Nukleophils ausgetestet und die Geometrie des Komplexes bewertet und somit Bindungshypothesen generiert.

DOCKTITE ist eine frei verfügbare Skriptsammlung für die Modellierungssoftware Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group, Montreal, Canada)[193] und wurde 2015 von Schmidt et al. vorgestellt.[194] In dieser Methode wird eine chemisch reaktive Gruppe (CRG) durch vordefinierte Transformationen mit einer Markierung versehen, wo die nukleophile Seitenkette der Aminosäure angreift und welche gebundene Struktur daraus resultiert. Diese Aminosäure wird dann aus dem Protein entfernt und an der Stelle der einzelnen Atome ein eng definiertes Pharmakophor der Aminosäure erstellt. Somit wird das entstehende Produkt als eigener Ligand gedockt, was, im Gegensatz zu den anderen Algorithmen, eine simultane Modellierung verschiedener Elektrophile mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus erlaubt. Zudem erlaubt diese Methode eine hochgradig individualisierbare Modellierungsstrategie, die sich je nach Ligand, Enzym und Wirkmechanismus anpassen lässt. Zudem ist eine Kombination mit weiteren Modellierungsstrategien möglich, wie zum Beispiel weiteren Pharmakophor-Eigenschaften, Vorlagen-basiertes *Docking* und die Einführung medizinal-chemischer Transformationen. Die Validierung von DOCKTITE erfolgte anhand eines Standard-Satzes an gelösten Kristallstrukturen, welche bei der Entwicklung von *CovDock* angewendet wurden, und durch beide Programme präzise wiedergegeben werden können. Mit der Programmversion 2016 von MOE wurde ein ähnlicher Algorithmus zur Modellierung kovalent bindender Inhibitoren eingeführt. Dieser erlaubt jedoch nur die Modellierung einer einzelnen Transformation, während der Ansatz von DOCKTITE eine breites, simultanes *Docking* verschiedener Elektrophile erlaubt. Zudem liegt hier keine Evaluierung der Performance beispielsweise im *Redocking* vor.

Bis heute sind jedoch nur vereinzelt Studien veröffentlicht, welche die *in silico* Entdeckung von kovalent-bindenden Kinase – oder Protease-Inhibitoren beschreiben.

Rationales Design von kovalent bindenden FLT3- und Proteasom-Inhibitoren

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von rationalen Designstrategien zur computergestützten, prädiktiven Entdeckung kovalent-bindender FLT3- und Proteasom-Inhibitoren und die Hypothesen-Entwicklung möglicher Struktur-Aktivitätsbeziehungen. Dabei sollen ausgewählte Leitstrukturen synthetisiert und in biochemischen Testungen unter anderem hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung in Leukämiezellen evaluiert werden.

Das häufige Aufkommen von Resistenz-vermittelnden Mutationen in der zielgerichteten Tumortherapie führt zu einem stetigen Bedarf an neuen Inhibitoren mit verbesserten Eigenschaften. Mit der Zulassung der ersten irreversibel bindenden Kinase-Inhibitoren zeigte sich, dass Resistenzen gegenüber etablierten Therapien mit kovalent-bindenden Inhibitoren überwunden werden können. Zusätzlich wurde die rationale Entwicklung von kovalent bindenden Inhibitoren durch die Einführung verschiedener *Docking*-Algorithmen ermöglicht.[195] Trotzdem gibt es bisher nur vereinzelte Studien, die zeigen, dass eine prädiktive Modellierung effektiv verwendet werden kann, um kovalent bindende Inhibitoren zu entdecken. Insbesondere sind interdisziplinäre Ansätze, welche die *in silico* Modellierung, Synthese und biochemische Evaluierung ganzheitlich betrachten, und somit einen iterativen Algorithmus zur Erforschung kovalent bindender Inhibitoren ermöglichen, nicht beschrieben.

Strukturbasierte Entwicklung, Synthese und pharmakologische Charakterisierung von irreversiblen FLT3-Inhibitoren

Die strukturbasierte Entwicklung von irreversiblen FLT3-Inhibitoren soll ausgehend von einem zu entwickelnden Homologie-Modell der aktiven, DFG-*in* Konformation von FLT3 erfolgen. Darin sollen zuerst Modelle der Bindung von bekannten, reversiblen Inhibitoren erstellt werden. Anschließend sollen die FLT3-Ligand-Komplexe analysiert werden und eine fokussierte, virtuelle Bibliothek an reaktiven Inhibitoren durch Anknüpfung chemisch und sterisch diverser elektrophiler Gruppen erzeugt werden. Die mögliche Bindung der irreversiblen Liganden soll anschließend im kovalenten *Docking*

untersucht werden und eine rationale Auswahl an zu synthetisierenden Inhibitoren getroffen werden. Die entwickelten Inhibitoren sollen anschließend in biochemischen und toxikologischen Assays untersucht werden. Dabei sollen insbesondere zellbasierte Assays in der Arbeitsgruppe etabliert werden, um eine möglichst effiziente, iterative Wirkstoffforschung, bestehend aus chemo-informatischer Modellierung, organischer Synthese und biochemischer Charakterisierung zu ermöglichen. Insbesondere soll die irreversible Wirkung der Leitstrukturen und Vorteile gegenüber der Wirkung potenter, reversibler Inhibitoren in der gegenwärtigen klinischen Entwicklung gezeigt werden.

Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Charakterisierung von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren

In früheren Arbeiten wurde das α-Ketoamid Leitmotiv als hoch potentes, reversibles Strukturelement etabliert und verschiedene Kristallstrukturen im Komplex mit dem Proteasom aufgeklärt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die zytotoxische Wirkung deutlich geringer ist, als die der zugelassenen Inhibitoren **Carfilzomib** und **Bortezomib**. Deshalb sollen neue Ketoamid-Leitstrukturen computer-gestützt modelliert werden und in biochemischen Experimenten charakterisiert werden. Dazu soll auch die zellbasierte Umsetzung von künstlichen Proteasom-Substraten untersucht werden, um die Stärke der Proteasom-Inhibition in der Zelle nachzuweisen. Um eine Einschätzung der *off target*-Effekte zu treffen, soll die potenteste Substanz in einem Zebrafisch-Embryonen Assay auf Effekte, die den Fluchtreflex beeinflussen, untersucht werden.

Rationales Design möglicher zukünftiger Inhibitoren

Im dritten Teil der Dissertation sollen neue Leitstrukturen für die kovalente Inhibition der FLT3-Kinase und des Proteasoms anhand der vorliegenden Ergebnisse vorgeschlagen werden. Dazu gehört die Modellierung makrocyclischer Kinase-Inhibitoren und dual-kovalenter Immunoproteasom-Inhibitoren, welche zwei nukleophile Aminosäuren in der aktiven Tasche der β5i-Untereinheit angreifen.

3.1 Strukturbasierte Entwicklung und Charakterisierung von irreversibel bindenden FLT3-Inhibitoren

3.1.1 Entwicklung eines FLT3-Homologiemodells in der aktiven Konformation

Die Entwicklung von Therapie-resistenten Mutationen in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne durch Einführung einer Ein-Punkt-Mutation und Austausch von D835 ist der Hauptgrund der Entwicklung therapeutischer Resistenzen. Deshalb sollen kovalent-bindende Inhibitoren, die in der aktiven, DFG-*in* Konformation binden, entwickelt werden. Diese ist für die Bindung von ATP essenziell und kann somit nicht zur Bildung von Resistenzen führen. Die Struktur-basierte Entwicklung neuer Wirkstoffe ist jedoch nur mit einem 3D-Modell der entsprechenden Bindedomäne möglich. Für FLT3 ist zurzeit jedoch keine Struktur in dieser Konformation öffentlich verfügbar. Typischerweise kann diese durch Kokristallisation von dem FLT3-Konstrukt und einem Inhibitor, der diese Konformation bindet, oder ATP bzw. ADP erhalten werden. Deshalb musste für die Entwicklung von kovalent-bindenden FLT3-Inhibitoren ein Homologie-Modell von FLT3 in der DFG-in-Konformation erstellt werden. Dies wurde mit der *Homology-Modelling* Funktion von MOE durchgeführt. Als Vorlage wurde dabei die mit ADP-kokristallisierte Struktur der Rezeptor-Tyrosinkinase cKIT (CD 114) verwendet (PDB: 1PKG), die ebenfalls zur Familie der Klasse III-Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört. cKIT weist die höchste Sequenz-Identität und -Ähnlichkeit mit FLT3 von allen Kinasen auf (64% Identität, 79% Ähnlichkeit, Abbildung 35) und ist somit ein hervorragender Startpunkt für eine valide Homologie-Modellierung.

Sequenzidentität

	1	2	3
1:1PKG.A		64.2	64.2
2:FLT3 - DFG in	64.2		100.0
3:1RJB.A	64.2	100.0	

Sequenz-Homologie

	1	2	3
1:1PKG.A		79.3	79.3
2:FLT3 - DFG in	79.3		100.0
3:1RJB.A	79.3	100.0	

RMSD

	1	2	3
1:1PKG.A		0.01	5.99
2:FLT3 - DFG in	0.01		5.99
3:1RJB.A	5.99	5.99	

Abbildung 35. Analyse der Sequenz-Identität, der Sequenz-Homologie und der mittleren Abweichung der überlagerten Strukturen von cKIT in der DFG-*in*-Konformation (PDB: 1PKG), der inaktiven DFG-*out*-Form der FLT3-Kinase (PDB: 1RJB) und des Homologie-Modells der aktiven DFG-*in*-Struktur von FLT3.

Typischerweise wird dafür eine Homologie von 30 bis 40% als ausreichend betrachtet. Hier sind jedoch doppelt so viele, und nahezu alle Aminosäuren der ATP-Bindetasche, mit Ausnahme des *Gatekeeper*-Restes (FLT3: F691, cKIT: T670), konserviert. Die Erstellung des Homologie-Modells erfolgt anhand der Standard-Parameter der Modellierungssoftware. Die mittlere Abweichung (*root mean square deviation*, RMSD) zwischen der Vorlage und dem finalen FLT3-Homologiemodell in der aktiven Konformation beträgt 0.01 Å. Der RMSD-Wert zwischen der DFG-*in*- und der DFG-*out*-Struktur beträgt sowohl für FLT3 als auch für cKIT 5.99 Å. In Abbildung 36 ist die Struktur von FLT3-DFG-*out* mit dem FLT3-DFG-*in* Homologie-Modell überlagert. Während die *Hinge*-Region (gelb), die hydrophobe Region (orange) und die katalytische Schleife (rot) zwischen der aktiven und inaktiven Konformation konserviert sind, führt die Bindung von ADP im Homologie-Modell zur Reorientierung des DFG-Motivs vor der Aktivierungsschleife (blau), der α-C-Helix (violett) und Glycin-reichen Schleife (grün). Dabei wird Phe830 des DFG-Motivs in der hydrophoben Tasche der Kinase platziert, in der typischerweise Strukturmotive von Typ II-TKI liegen, somit wird eine Bindung von Inhibitoren in der aktiven Konformation ermöglicht.

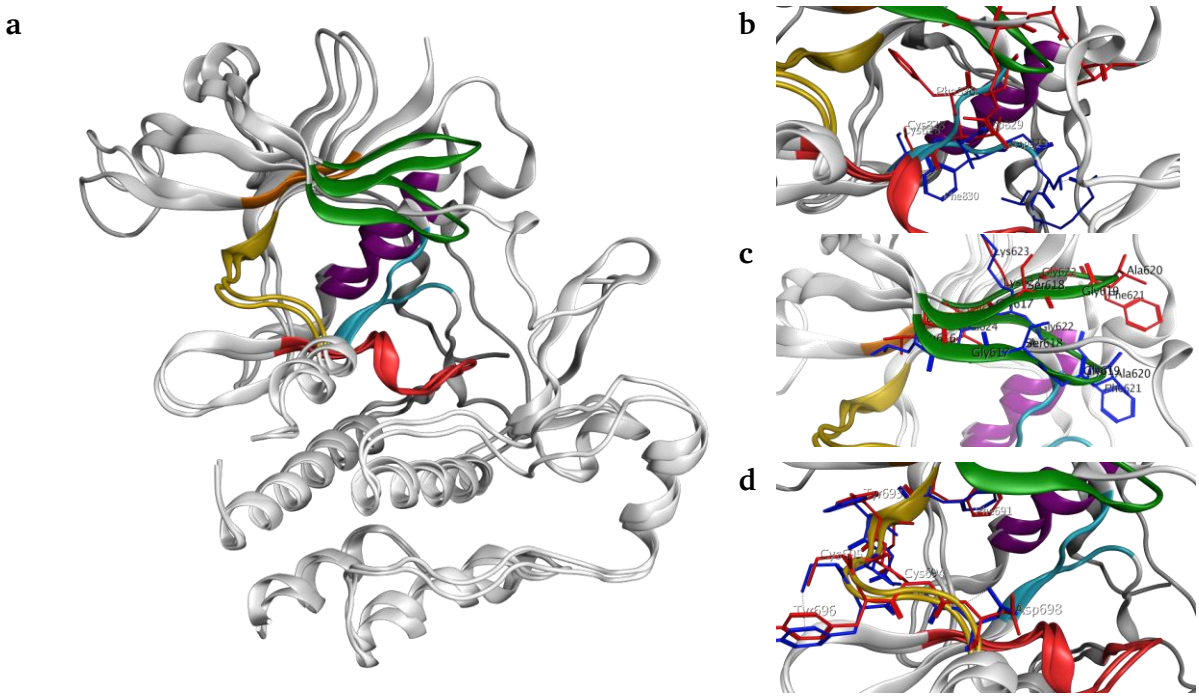


Abbildung 36. (a) Überlagerung der Strukturen von FLT3 in der aktiven DFG-*in* und der inaktiven DFG-*out* (PDB: 1RJB)[67] Konformation und Vergleich der Positionen des (b) DFG-Motivs, (c) der Glycin-reichen Schleife und (d) des *Hinge*-Motivs in der aktiven (blau) und inaktiven (rot) Konformation der Kinase.

Die Qualität eines Homologie-Modells kann mit Hilfe eines Ramachandran-Plots beurteilt werden. Dieser gibt das Verhältnis von erlaubten Phi zu Psi-Winkeln an, wobei hier der Plot für den allgemeinen Fall angewendet wird. Die Analyse für das FLT3-Homologiemodell zeigt vier Aminosäuren, die außerhalb des üblichen Rahmens sind (Tyr 599, Arg849, Asn841, Ser840; Abbildung 37). Diese sind alle außerhalb der ATP-Bindestelle lokalisiert und beeinflussen deshalb das *Docking* in dieser Stelle nicht. Somit stellt das Modell einen validen Startpunkt für die Modellierung von ATP-kompetitiven FLT3-Inhibitoren dar.

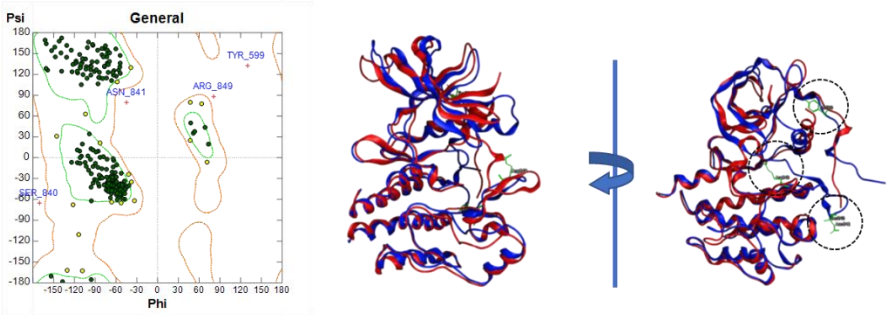


Abbildung 37. Ramachandran-Plot der Aminosäuren im Homologie-Modell von FLT3. Das Verhältnis der Phi zu Psi-Winkel von Tyr599, Ser840, Asn841 und Arg849 liegt außerhalb des üblich Rahmens. Alle Reste sind von der ATP-Bindungsstelle entfernt.

Das Modell sollte zusätzlich durch kovalentes *Docking* von **Hypothemycin** validiert werden. **Hypothemycin** ist der einzig bekannte, kovalente FLT3 Inhibitor, für den mit einer anderen Kinase (ERK2, PDB: 3C9W) eine Struktur kristallografisch gelöst werden konnte. Für das *Redocking* wurde das Homologie-Modell von FLT3 mit der ERK2 Struktur überlagert, der zentrale Phenylring der Resorzinsäure als Pharmakophor (d = 2.0 Å) definiert und für das *Docking* zusammen mit den Atom-Pharmakophoren der Cystein-Seitenkette (Cys828) als Platzierungsmethode für das kovalente *Docking* verwendet. Die best-bewertete Konformation von **Hypothemycin** in FLT3-DFG-*in* (Abbildung 38) zeigt einen ähnlichen Bindungsmodus wie **Hypothemycin** in ERK2. Das kovalente *Redocking* von **Hypothemycin** in ERK2 ergab einen RMSD-Wert von 1.08 Å zur kristallisierten Struktur. Der strukturelle Vergleich der Position in FLT3 mit dem Komplex in ERK2 ist jedoch nicht aussagekräftig, da hier eine unterschiedliche Positionierung der Atome des Protein-Rückgrats vorliegt. Um die Bindungs-Konformationen besser vergleichen zu können, wurden die Liganden in einer rigiden Überlagerung, bei der nur die absolute Position der Liganden zueinander geändert wird, aber nicht die Konformation der Liganden selbst, miteinander verglichen (Abbildung

38c). Dadurch ergibt sich ein sehr geringer RMSD-Wert von 1.34 Å als Unterschied zwischen den Konformationen. Dies ist umso bemerkenswerter, das es sich um ein Homologie-Modell handelt, und, bis auf die Pharmakophor-Eigenschaften, ein unvoreingenommenes *de novo Docking* durchgeführt wurde.

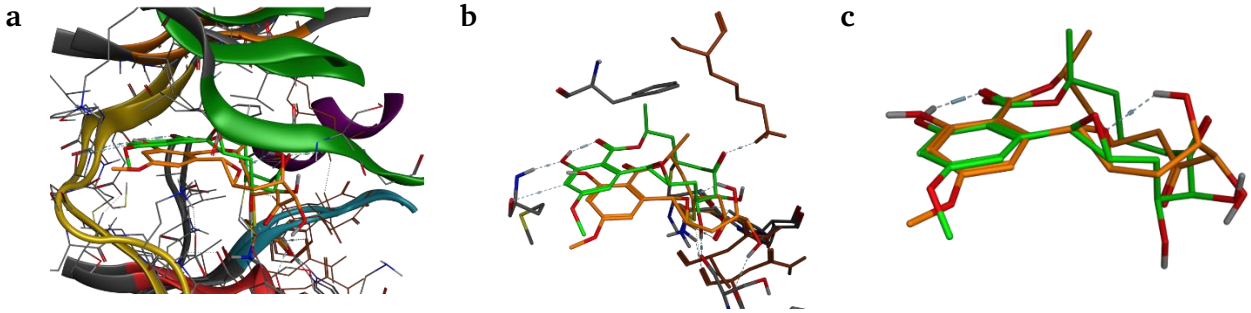


Abbildung 38. (a) Kovalentes *Docking* von Hypothemycin in das FLT3 DFG-*in* Homologie-Modell (braun) und Überlagerung mit der ERK2 Kristallstruktur (grün, PDB: 3C9W). (b) Interaktionen von Hypothemycin in der ATP-Bindungstasche und (c) rigide Überlagerung der isolierten Konformationen.

3.1.2 Analyse der Bindungsmodi bekannter FLT3-Inhibitoren in der aktiven Konformation

Die Bindungsstärke von kovalent bindenden Inhibitoren wird maßgeblich durch die räumliche Nähe der elektrophilen Gruppe zum Nukleophil und der Bildung eines relativ stabilen, transienten, reversiblen Komplexes bestimmt, um eine kovalente Bindungsbildung zu ermöglichen. Somit muss eine akzeptable, reversible Aktivität des Inhibitor-Grundgerüstes vorliegen. Dieses darf jedoch nicht zu groß sein, damit eine nachfolgende Optimierung des *Screening*-Treffers in einer *Hit-to-Lead*-Optimierung und einer weiteren Leitstrukturoptimierung möglich ist. Idealerweise ist die Struktur so klein gewählt, dass durch definierte Interaktionen, besonders Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen, klare Anhaltspunkt für die Aktivität oder Inaktivität eines Grundgerüsts geliefert werden. Aufgrund der vielfältigen Anstrengungen zur Entwicklung von FLT3-Inhibitoren ergibt sich somit die Analyse von bekannten *Hinge*-bindenden Strukturen als vielversprechender Startpunkt für eine Optimierung. Der Vorteil dieses Ansatzes ist zudem die Ausnutzung stark enthalpischer Wechselwirkungen, die durch mono-, di- oder tridentate *Hinge*-bindende Motive hervorgerufen werden. Um solche Strukturen zu finden wurde die öffentlich

zugängliche *BindingDB Database*[196] nach FLT3-Inhibitoren mit unterschiedlichen *Hinge*-bindenden, privilegierten Grundgerüsten durchsucht (Abbildung 39).

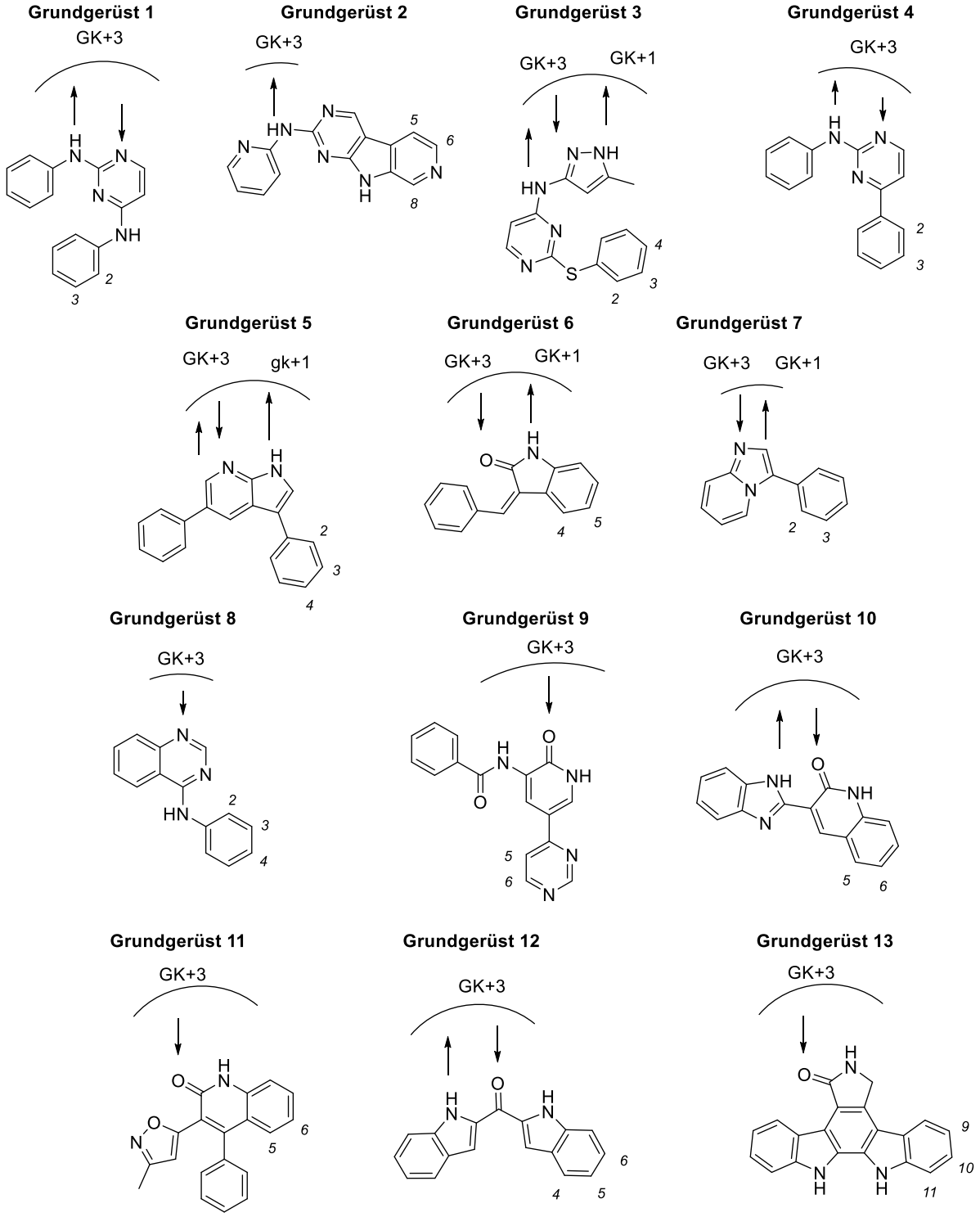


Abbildung 39. Strukturen der ausgewählten reversiblen DFG-*in* bindenden Inhibitoren und Wechselwirkungen mit der *Hinge*-Region, sowie geeignete Substitutionspunkte für elektrophile Gruppen. GK = *Gatekeeper*-Rest.

Von den 1752 hinterlegten Inhibitoren (Stand: Januar 2015) wurden nur solche Inhibitoren ausgewählt, die ein klar definiertes *Hinge*-bindendes Motiv besitzen und kein Substitutionsmuster besitzen, das typischerweise ein Typ II-TKI beinhaltet, wie zum Beispiel **Sorafenib**, **Quizartinib** und **Tandutinib**. Diese besitzen eine Arylharnstoff-Einheit, die in der hydrophoben Bindetasche der inaktiven Kinase-Konformation bindet, in der typischerweise das Phe des DFG-Motivs in der aktiven Konformation lokalisiert ist und einen entscheidenden Teil der Bindungsaffinität liefert (Abbildung 40). Durch diese Analyse konnten 13 verschiedene *Hinge*-bindende Gruppen identifiziert werden, die entweder über mono- (5 Grundgerüste), bi- (6 Grundgerüste) oder tridentate Wechselwirkungen (2 Grundgerüste) mit den GK+1- (Glu692) und GK+3- (Cys694)-Resten interagieren, die den typischen Bindungsmustern der privilegierten Grundgerüste entsprechen. Die Analyse der Cystein-Reste in der ATP-Bindetasche zeigt drei Cysteine: Cys828, Cys694 und Cys695 (Abbildung 40). Zwei davon sind Teil der *Hinge*-Region (Cys694, Cys695) während Cys828 vor dem DFG-Motiv liegt und von **Hypothemycin** angegriffen wird.

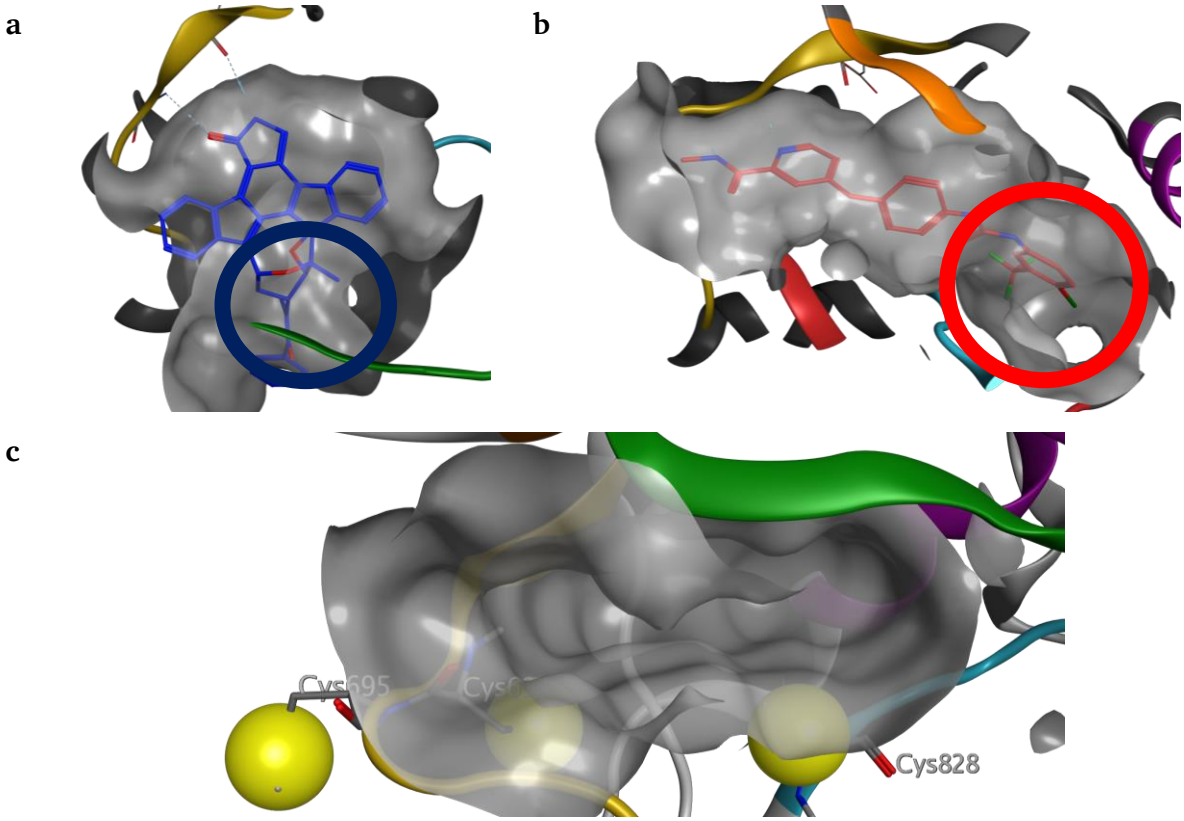


Abbildung 40. Bindung von (a) **Midostaurin** in der aktiven DFG-*in*-Konformation von DYRK1 unter Besetzung der Ribose-Bindungstasche (blau, PDB: 4NCT) und (b) **Sorafenib** in der DFG-*out*-Konformation von VEGFR2 mit Besetzung der regulatorischen Tasche (rot, PDB: 3WZE). (c) Position von Cys694, Cys695 (links) und Cys828 (rechts) in der ATP-Bindungstasche des FLT3-DFG-*in*-Modells. Das nukleophile Schwefel-Atom ist als Kugel dargestellt.

Cys828 erscheint durch die ausgewählten *Hinge*-bindenden Motive am einfachsten adressierbar, da alle Grundgerüste eine Phenyleinheit besitzen, die in das hintere Ende der Bindetasche zum DFG-Motiv gerichtet sind. Zudem soll das *Hinge*-bindende Motiv möglichst unverändert bleiben. Für die Interaktion mit Cys695 müsste dieses hingegen massiv verändert werden. Eine Adressierung von Cys694 erscheint mit solchen *Hinge*-bindenden Motiven nicht möglich, da die Oberfläche des Grundgerüsts bereits auf der Oberfläche von Cys694 liegt und somit keine plausible Substitution erlaubt wird. Dieser Rest könnte aber beispielsweise von einem Inhibitor, der keine Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen mit der *Hinge*-Region eingeht, sondern stattdessen die hydrophobe Bindetasche adressiert, umsetzbar sein. Ein weiterer Vorteil der Adressierung von Cys828 ist zudem die Exponiertheit in die ATP-Bindetasche. Zusätzlich wird eine Variation der Eingangstrajektorie des Elektrophils erlaubt, wodurch eine Bindungsbildung moduliert werden kann.

Im Anschluss an die Etablierung der reversiblen Bindungshypothesen wurden vier chemisch und sterisch unterschiedliche elektrophile-Gruppen ausgewählt, die an die ausgewählten Grundgerüste angeknüpft und anschließend im virtuellen *Screening* evaluiert werden sollten (Abbildung 41). Das Acrylamid-, das Vinylsulfonamid- und das Propargylamid-Elektrophil haben eine Ausdehnung zwischen einer möglichen Substitutionsstelle am Inhibitor und dem elektrophilen Kohlenstoff-Atom von ca. 5 Å. Das um eine C-Einheit verkürzte α-Haloacetamid-Elektrophil hat eine Ausdehnung von 3.8 Å. Diese Gruppe stellt einen Spezialfall unter den verwendeten dar. Zum einen ist es die einzige Gruppe, die eine nukleophile Substitution eingeht, während die anderen über eine Michael-Addition reagieren. Zum anderen ist das Strukturmotiv chemisch variabel, da sowohl 2-Fluor-, 2-Chlor-, 2-Brom- als auch 2-Iodacetamide abgeleitet werden können, wobei diese im kovalenten *Docking* aber identisch sind. Aus der Ausdehnung der Elektrophile lässt sich schließen, dass eine Entfernung von maximal 5 Å zwischen dem Nukleophil und dem Anknüpfungspunkt der elektrophilen Seitenkette an den reversiblen Inhibitor liegen sollte, um eine kovalente Modifikation zu ermöglichen. Entscheidend ist dabei eine synthetisch plausible und breit anwendbare Anknüpfung, die idealerweise eine divergente Synthese unterschiedlicher reaktiver Inhibitoren in einem späten Schritt erlaubt. Alle verwendeten elektrophile Kopfgruppen erlauben eine Anknüpfung über eine Amin-Gruppe, die wiederum als Substituent an Phenylringen synthetisch breit zugänglich ist. Diese Anknüpfung kann prinzipiell auch

anhand einer benzylischen Position oder heterozyklischen, beispielsweise von einer Pyrrol-abgeleiteten Struktur erfolgen. Vorteile einer solchen Strategie wären veränderte sterische Eigenschaften, wodurch wiederum die Bindungstrajektorie modulierbar wird und mögliche elektronische Variationen, die eine veränderte Reaktivität erlauben.

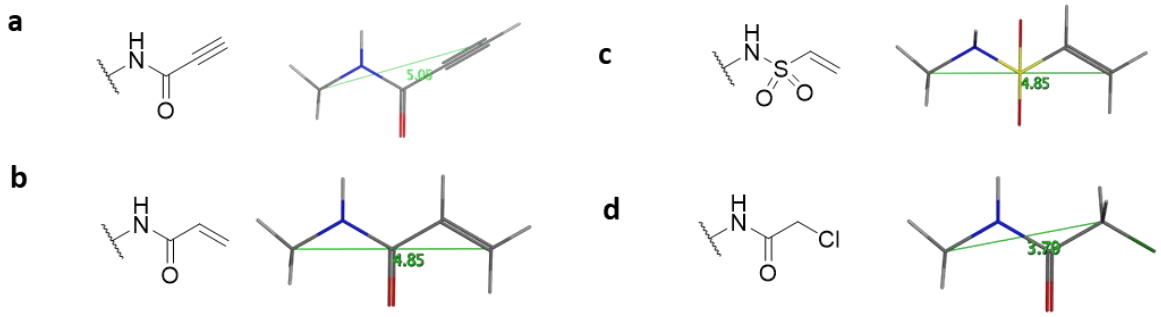


Abbildung 41. Strukturen der verwendeten Cystein-reaktiven Gruppen. (a) Propargylamid; (b) Acrylamid; (c) Vinylsulfonamid; (d) 2-Haloacetamid. Die Ausdehnung der Elektrophile ist grün dargestellt (Länge / Å).

Im nächsten Schritt wurden geeignete Anknüpfungspunkte an Phenylringen der reversibel modellierten Inhibitoren innerhalb von 5 Å identifiziert (Details in Kapitel 5.1), und daraus eine virtuelle *Screening*-Bibliothek an Derivaten erstellt, die als Ausgangsstrukturen für das kovalente *Docking* dienten. Dabei wurden 32 Anknüpfungspunkte an den 13 Inhibitor-Grundgerüsten identifiziert, wodurch sich mit den vier elektrophilen Gruppen 128 Liganden ergeben (Tabelle 1). Da die Addition von Nukleophilen an die Propargylamid-Gruppe in der E- oder Z-Position resultieren kann, ergeben sich nach Anknüpfung der nukleophilen Seitenkette 160 Strukturen für das kovalente *Docking*.

Das kovalente *Docking* wurde dann mit dem bereits vorgestelltem DOCKTITE-Skript durchgeführt. Dabei wurden die Derivate aus der virtuellen Bibliothek mittels der Pharmakophor-Platzierungsmethode in das für das jeweilige Grundgerüst definierte Pharmakophor platziert. Eine beispielhafte Durchführung ist anhand des 7-Azaindol-Grundgerüst 5 in Abbildung 42 dargestellt.

Tabelle 1. Übersicht der Anzahl der Anknüpfungspunkte an die reversiblen Inhibitoren und die daraus resultierende Anzahl der Derivate im kovalenten *Docking*.

Grundgerüst	Anzahl an Anknüpfungspunkten	Anzahl der Derivate	Anzahl der Liganden nach Anknüpfung der Seitenkette	Quelle
1	2	8	10	197
2	3	12	15	198
3	3	12	15	199
4	2	8	10	200-201
5	3	12	15	202
6	2	8	10	203-205
7	2	8	10	206-208
8	3	12	15	209
9	2	8	10	210
10	2	8	10	211
11	2	8	10	212
12	3	12	15	213
13	3	12	15	214
Summe	**32**	**128**	**160**	

Das Pharmakophormodell des Inhibitor-Grundgerüsts besteht typischerweise aus den aromatischen und den Donor- und Akzeptor-Eigenschaften des *Hinge*-bindenden Motivs. Dies erlaubt ein besonders effizientes *Docking*, da sowohl nach konservierten, klar definierten Protein-Ligand-Interaktionen ausgewählt werden kann und zudem keine ausschließlich zufällige Platzierung erfolgt, die eine prädiktive Modellierung erschweren würde. Außerdem ist diese Art der Platzierung und Auswahl während des *Docking* in Bezug auf die Rechenzeit deutlich weniger anspruchsvoll, als eine zufalls-basierte Platzierung und Optimierung.

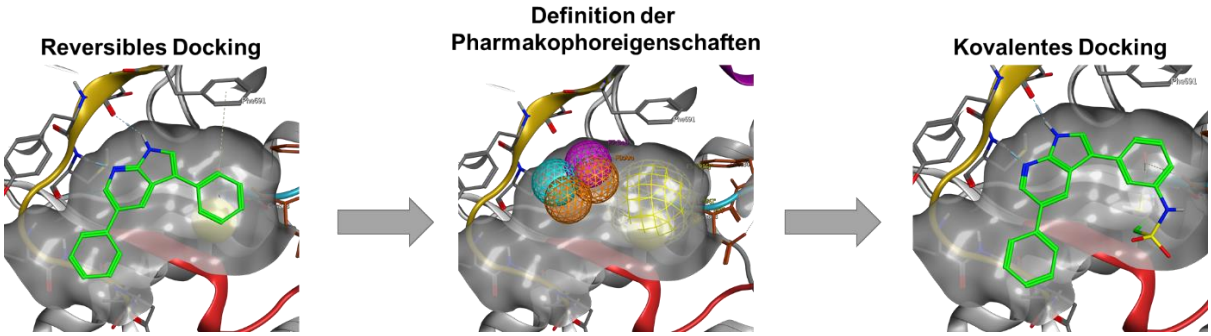


Abbildung 42. Übersicht der entwickelten *Screening*-Strategie zur Entdeckung kovalent-bindender FLT3-Inhibitoren anhand des 7-Azaindol Grundgerüsts 5. Nach dem reversiblen *Docking* in das FLT3-DFG-*in* Homologie-Modell werden die zentralen Pharmakophor-Eigenschaften des *Hinge*-bindenden Motivs definiert und dienen dann mit dem Pharmakophor von Cys828 als Startpunkt für die Platzierung des kovalent bindenden Liganden im virtuellen *Screening*. In diesem Beispiel resultiert das 3-Vinylsulfonamid (Rang 25, London dG = -14.38 kcal/mol, LE_V = -0.533).

Im Gegensatz zu den Standard-Parametern von DOCKTITE wurde jedoch das nukleophile Schwefel-Atom als ein vergrößertes Pharmakophor definiert (d = 3.0 Å), um verschiedene Rotamere von Cys828 und damit einen *induced fit* Mechanismus zu ermöglichen. Die Atome des Rückgrats und des C^{β}-Atoms der Seitenkette wurden in einem stringenten Pharmakophor belassen (d = 0.4 Å), um die ursprüngliche Konformation der Vorlagenstruktur mit ADP wiederzuspiegeln und die Architektur der Kinase nicht zu beeinflussen.

Durch das kovalente *Docking* wurden 831 *Docking*-Positionen erhalten (Abbildung 43). Anschließend wurde die nukleophile Seitenkette abgespalten, um eine robuste Bewertung durch *Scoring*-Funktionen zu erhalten, die auf die Bewertung nicht-kovalenter Protein-Ligand-Komplexe optimiert sind. Da die Donor-Akzeptor-Interaktionen der Liganden mit der *Hinge*-Region der Kinase insbesondere bei kleinen Molekülen starke Wasserstoffbrücken-Bindungen eingehen und somit essentiell für die Inhibitionsstärke sind, wurden die erhaltenen Positionen nach Wechselwirkungen mit mindestens einem der Rückgratreste Glu692 (GK+1, Carbonyl-Akzeptor) und Cys694 (GK+3, N-H Donor oder Carbonyl-Akzeptor) gefiltert. Dafür wurde die PLIF-Funktion (*Protein-Ligand-Interaction Fingerprints*) von MOE verwendet. Die so erhaltenen 404 *Docking*-Positionen wurden mit der Wissens-basierten DSX-Bewertungsfunktion neu bewertet und nur maximal 5 der höchst-bewerteten Posen wurden in den nachfolgenden Schritten verwendet, wobei 319 Posen erhalten wurden. Der Vorteil dieser kombinatorischen Bewertungsstrategie (*Consensus-Scoring*) ist, dass einerseits eine effiziente Bewertungsfunktion während der Modellierung gewählt wird, um die Computerzeit zu verringern, zum anderen aber komplexere, Wissens-basierte Faktoren in die Bewertung der endgültigen Strukturen und damit die Auswahl von Synthese-Kandidaten einfließen zu lassen.

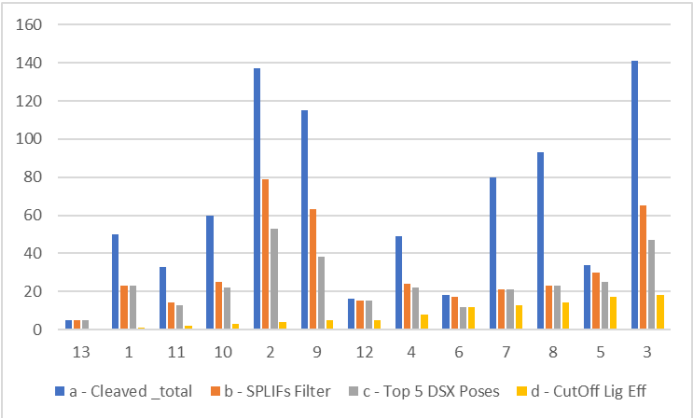
Im letzten Filter-Schritt wurde die virtuelle Liganden-Effizienz (LE_V) der Strukturen anhand des London dG *Scoring*-Wertes und der Anzahl der nicht-Wasserstoffatome beziehungsweise Schweratome (*heavy atoms*, HA) nach folgender Gleichung ermittelt:

$$LE_V = \frac{London\ dG\ Score}{Anzahl\ der\ Schweratome}$$

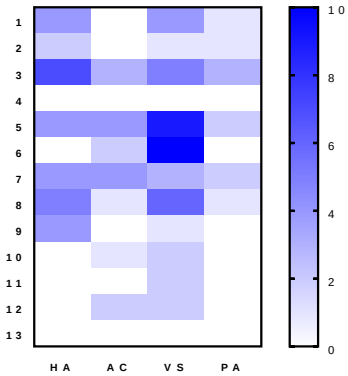
Dabei verblieben 102 *Docking*-Positionen mit einer Liganden-Effizienz von weniger als -0.5 kcal / HA die sich auf 50 Inhibitoren verteilen (Kapitel 5.1.2). Von den 13 Grundgerüsten ergaben sich für 5 Grundgerüste mehr als 10 *Docking*-Positionen, wobei im Durchschnitt 32% der ursprünglichen *Docking*-Positionen beibehalten wurden, während für die Grundgerüste mit weniger als 10 *Docking*-Positionen nur 8% beibehalten wurden. Die meisten *Docking*-Positionen ergaben sich dabei für das Bisaminopyrimidin-Grundgerüst 3 (18 Positionen), während das Indolinon-Grundgerüst 6 die höchste Rate an beibehalten *Docking*-Positionen während den Filter-Schritten aufwies (67%). Die Anzahl der *Screening*-Treffer variiert stark mit dem Elektrophil; so stellen Vinylsulfonamide die häufigste Gruppe dar (45% der Treffer), gefolgt von den α-Haloacetamiden (29%), den Acrylamiden (16 %) und den Propargylamiden (10%). Eine Auswahl von irreversiblen Treffern ist in Abbildung 43 dargestellt und in Kapitel 5.1.2 beschrieben.

a

Scaffold	a - Cleaved _total	b - SPLIFs Filter	c - Top 5 DSX Poses	d - CutOff Lig Eff	% of initial	mean
13	5	5	5	0	0,00	0,08
1	50	23	23	1	0,02	
11	33	14	13	2	0,06	
10	60	25	22	3	0,05	
2	137	79	53	4	0,03	
9	115	63	38	5	0,04	
12	16	15	15	5	0,31	
4	49	24	22	8	0,16	
6	18	17	12	12	0,67	0,32
7	80	21	21	13	0,16	
8	93	23	23	14	0,15	
5	34	30	25	17	0,50	
3	141	65	47	18	0,13	
Summe	**831**	**404**	**319**	**102**	**0,12**	



b



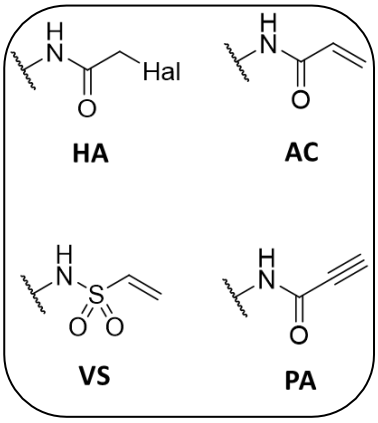


Abbildung 43. (a) Verteilung der Anzahl der *Docking*-Positionen während der Filterschritte nach Grundgerüsten. (b) Struktur der CRGs und Verteilung der Anzahl der *Docking*-Positionen nach Grundgerüsten. Strukturen der verwendeten elektrophilen Gruppen: 2-Haloacetamid (HA), Acrylamid (AC), Vinylsulfonamid (VS) und Propargylamid (PA).

3.1.3 Synthese und Evaluierung der reversiblen Inhibitoren

Da für eine potente und selektive, kovalente Inhibition eine zumindest moderate Affinität zwischen dem Zielprotein und dem der Inaktivierung vorgelagerten, reversiblen Bindungskomplex nötig ist, sollten zunächst die Aktivitäten der reversiblen Grundgerüste, die im virtuellen *Screening* als geeignete Startpunkte identifiziert wurden, gegenüber FLT3 und der AML-Zelllinie MV4-11 bestimmt werden (Tabelle 2). MV4-11-Zellen exprimieren eine FLT3(ITD)-Mutation, deren Inhibition zur Apoptose der Zellen führt und somit ein Maß für die Inhibition der Kinase in der Zelle ist, was somit einen ersten Hinweis zur therapeutischen Wirksamkeit darstellt. So sollte eine weitere Vorauswahl der Grundgerüste für die nachfolgende Synthese der elektrophilen Hybridstrukturen getroffen werden, um die Trefferrate und die Erfolgswahrscheinlichkeit dieser Entwicklungsstrategie zu erhöhen. Dabei stehen die fünf Grundgerüste mit mehr als 10 Treffern im Fokus (Grundgerüst 3, 5, 6, 7 und 8). Aufgrund des hohen synthetischen Aufwands wurden das 7-Azaindol-Grundgerüst 5, das Bisaminopyrimidine-Grundgerüst 3 und das Chinazolin-Grundgerüst 8 im Rahmen der Dissertation von Theresa Neumann[215] synthetisiert und für die Evaluierung im Rahmen dieser Dissertation zur Verfügung gestellt. Die Synthese des Indolinon-Grundgerüsts 6 und des Imidazopyridin-Grundgerüsts 7 erfolgte im Rahmen dieser Dissertation. Die biochemischen Experimente und die molekularen Modellierungen, die in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben werden, sind alle im Rahmen dieser Dissertation entstanden.

Die Synthese der reversiblen Fragmente ist an bereits etablierte Synthesevorschriften angelehnt und stellt einen Vorteil der angewendeten Designstrategie dar, da die Evaluierung und Optimierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und nicht die Etablierung einer synthetischen Route im Vordergrund stehen kann. Somit ist eine schnelle Identifikation von in der Regel nicht Patent-geschützten, elektrophilen Inhibitoren möglich.

Das Imidazopyridin **BSc5221** wurde dabei durch eine Heck-ähnliche, Palladium-katalysierte Kupplung aus Imidazo[1,2-a]pyridin und Brombenzol in einem Mikrowellenreaktor, in Anlehnung an Frett et al., in 58% Ausbeute hergestellt

(Kapitel 5.2.2.1). Die Indolinon-basierten Inhibitoren **BSc5229** und **BSc5230** wurden durch eine Knoevenagel-Kondensation von 2-Oxindol mit Pyrrol-2-carbaldehyd bzw. Benzaldehyd in 42% bzw. 37% Ausbeute hergestellt (Kapitel 5.2.2.2 ff).

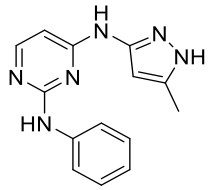
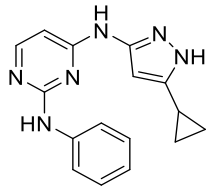
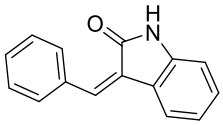
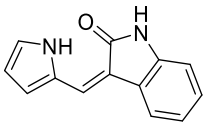
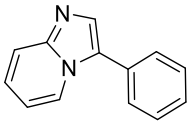
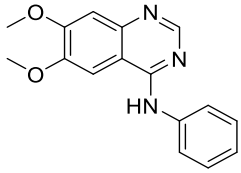
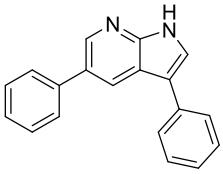
Die Inhibition von FLT3*wt* und der Ser/Thr-Kinasen GSK3α und GSK3β wurde durch die *KinaseProfiler*-Plattform von *Eurofins* bestimmt (Kapitel 5.3.1.6.2). Die Inhibition von FLT3(D835Y) wurde mit dem ADP Glo Assay bestimmt (Kapitel 5.3.1.6.1). Dieses ermöglicht die chemolumineszente, indirekte Bestimmung der ADP-Bildung durch die Kinase-Reaktion und ist auch auf andere Mutationen der FLT3 und andere Kinasen anwendbar. Ein weiterer Vorteil besteht in der Variation verschiedener Parameter, beispielsweise der Vorinkubationszeit von Enzym mit Inhibitor vor dem Start der Kinasereaktion, als auch der ATP-Konzentration. Solche Variationen werden durch externe Dienstleistungsunternehmen nur eingeschränkt angeboten. Die zytotoxische Wirkung der Inhibitoren wurde nach einer Inkubationszeit von 72 h mit einem fluorometrischen Assay bestimmt. Dabei erfolgte zuerst die Evaluierung in der FLT3-abhängigen Zelllinie MV4-11, wobei in späteren Experimenten auch die Selektivität der Inhibitoren in Zellen getestet wurden, die kein FLT3 exprimieren und somit einen Hinweis auf eine Proto-Onkogen-selektive zytoxische Wirkung erlaubt.

Unter den reversiblen Inhibitoren ist das Bisaminopyrimidin **BSc5224** die am stärksten zytotoxische Verbindung (89% geringere Zellviabilität bei 10 μM Inhibitor) und der stärkste Inhibitor von FLT3*wt* (82%, 1 μM Inhibitor). Das Indolinon **BSc5230** zeigt eine vergleichbar starke Inhibition von FLT3*wt* (60%) und FLT3(D835Y) (45%), ist das kleinste Molekülgerüst und hat eine hohe Liganden-Effizienz im virtuellen *Screening*. Das Imidazopyridin **BSc5221** und das Chinazolin **BSc5225** sind weniger potente Inhibitoren von FLT3(D835Y) während das 7-Azaindol **BSc5226** nur eine geringe Inhibition von FLT3*wt* aufweist, jedoch in der FLT3(D835Y) Mutation eine hohe Inhibition zeigt (83%).

Insgesamt zeigten jedoch alle getesteten, reversiblen Inhibitoren in der ersten Serie nur eine geringe zytotoxische Aktivität (MV4-11 IC_{50} > 1.000 nM). Um die reversible Bindungsstärke zu erhöhen, wurden kleine Änderungen an den vielversprechendsten Inhibitoren **BSc5224** und **BSc5230** eingeführt. Diese sind mit der initialen, reversiblen *Docking*-Position der Treffer vereinbar und ändern die Position der *Hinge*-bindenden Motive und des Elektrophils nicht (siehe Kapitel 5.1.2).

Der Austausch des Phenyl-Rings in **BSc5230** mit einem 2-Pyrrol-Ring erzwingt eine planare Konformation des Liganden durch die Bildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung (Abbildung 44). Im Bisaminopyrimidin-Grundgerüst wurde die 5-Methyl-Gruppe des Pyrazolyl-Amins in **BSc5224** durch einen Cyclopropyl-Ring ersetzt. Die entsprechende Struktur ist ebenfalls als FLT3- und promiskuitiver Kinase-Inhibitor beschrieben ist.[216]

Tabelle 2. Inhibition der FLT3wt, FLT3(D835Y) und GSK3α/β-Kinaseaktivität und der MV4-11 Zellviabilität nach Behandlung mit den ausgewählten, reversibel bindenden Fragmenten. [a]ADP-Glo Assay; [b]Eurofins KinaseProfiler.

Struktur	Verbindung	Grundgerüst	IC_{50} (MV4-11) / nM	Relative Inhibition (c_{TKI} = 1 µM) / %			
				FLT3*wt* [b]	FLT3 (D835Y)[a]	GSK3α[b]	GSK3β[b]
	**BSc5224**	3	> 1.000	82	15	47	50
	**BSc5231**	3	230 ± 53	98	88	74	76
	**BSc5230**	6	> 1.000	60	45	-8	-10
	**BSc5229**	6	380 ± 21	97	86	12	-6
	**BSc5221**	7	> 1.000	76	8	0	0
	**BSc5225**	8	> 1.000	26	25	0	0
	**BSc5226**	5	> 1.000	25	83	8	2

Diese Modifikationen erhöht die zytotoxische Aktivität beider Grundgerüste massiv. Das Indolinon-Derivat **BSc5229** zeigt eine gute zytotoxische Aktivität und eine hohe Liganden-Effizienz (MV4-11 IC_{50} = 380 ± 21 nM) und eine starke Inhibition der FLT3*wt*- (97%, 1μM Inhibitor) und FLT3(D835Y)-Aktivität (86%, 1 μM Inhibitor). Das Bisaminopyrimidin-Derivat **BSc5231** zeigt eine gesteigerte zytotoxische Aktivität, aber eine etwas geringere Liganden-Effizienz (MV4-11 IC_{50} = 230 ± 53 nM) und eine vergleichbare Inhibition der FLT3*wt*- (98%, 1 μM Inhibitor) und FLT3(D835Y)-Aktivität (88%, 1 μM Inhibitor). Dadurch sind beide Strukturen ein effizienter Startpunkt für die Entwicklung irreversibler Inhibitoren. Die gleichen Modifikationen wurden auch für die Konformationen der molekularen Modellierung eingeführt und ändern die Position des *Hinge*-bindenden Motivs und der elektrophilen Gruppe kaum.

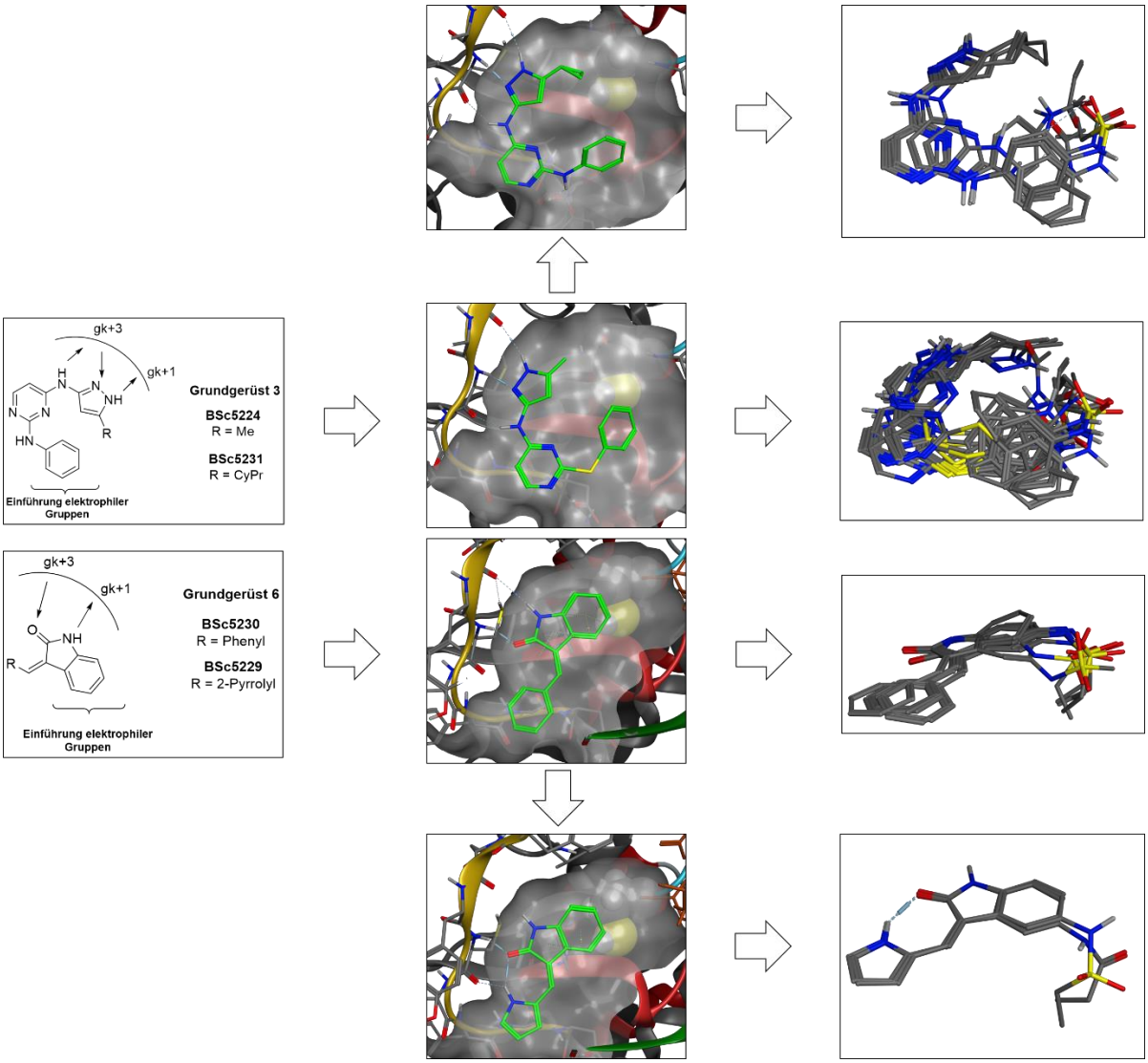
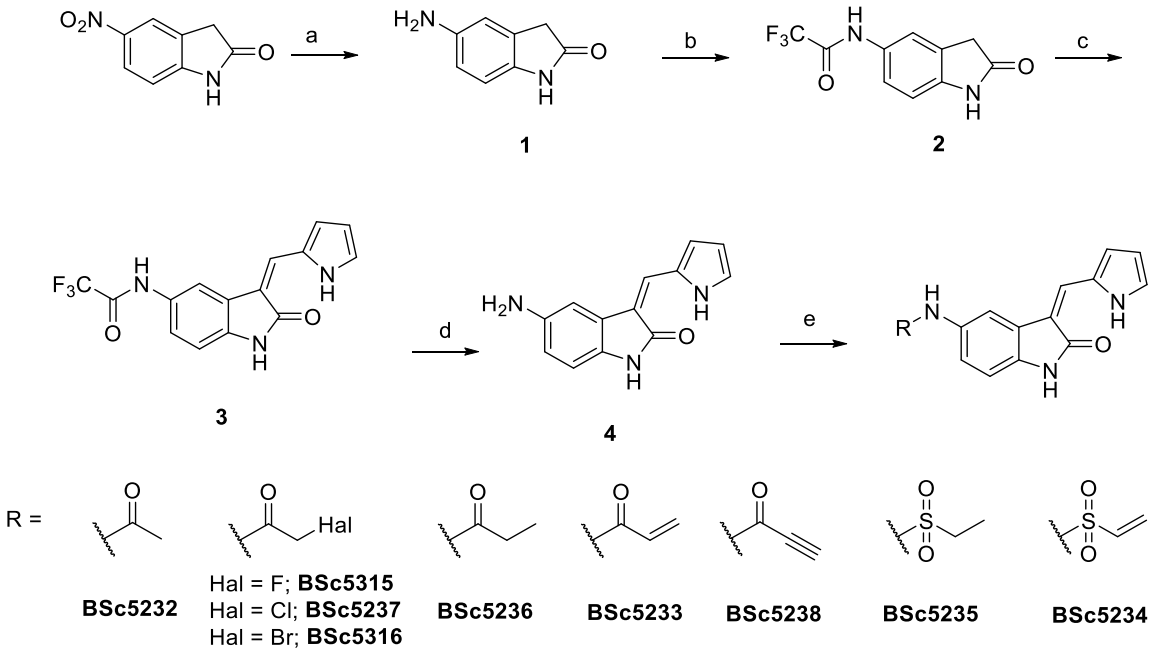


Abbildung 44. Rationales Design (links), reversibles (Mitte) und kovalentes *Docking* (rechts) des Bisaminopyrimidin Grundgerüsts 3 und dem Indolinon-Inhibitor Grundgerüst 6 (gk = *Gatekeeper* Rest).

3.1.4 Synthese und biochemische Evaluierung von Indolinon-Derivaten

Insgesamt wurden neun verschiedene Indolinon-Derivate basierend auf dem reversiblen Treffer **BSc5229** synthetisiert und auf ihre zytotoxische Wirkung untersucht. Zu den mit elektrophilen Gruppen substituierten Inhibitoren wurden auch die analogen, unreaktiven Inhibitoren synthetisiert, um den Einfluss der verknüpfenden Amid- oder Sulfonamid-Gruppe auf die reversible Aktivität zu evaluieren, sowie Inhibitoren, die keine Treffer im *Screening* waren, um die Trefferrate des *Screening* einschätzen zu können. Der Unterschied in der Aktivität zwischen dem elektrophilen und dem unreaktiven Derivat gibt einen starken Hinweis auf das Vorliegen einer kovalenten, irreversiblen Bindung zwischen Substrat und Inhibitor. Die Synthese erfolgte mit der gleichen Strategie wie bereits beschrieben. Damit eine divergente Synthese ermöglicht wird, erfolgte die Freisetzung des Amins in der Syntheseroute als direkte Vorstufe der elektrophilen Inhibitoren, die im letzten Schritt hergestellt werden. Die Synthese geht von dem kommerziell verfügbaren 5-Nitro-2-oxindol aus (Schema 1). Dieses wurde katalytisch hydriert und das so erhaltene Amin **1** (96% Ausbeute) mit Trifluoressigsäureanhydrid in Gegenwart von Pyridin geschützt (**2**, 80% Ausbeute).



Schema 1. Synthese von 5-substitutierten Indolinon-Derivaten. (a) H_2, Pd/C, MeOH, Raumtemperatur, 18 h. (b) Trifluoressigsäure-Anhydrid, Pyridin, DMF, 0°C, 2 h. (c) Pyrrol-2-carbaldehyd, kat. Piperidin, Mikrowellenreaktor, Ethanol, 130°C, 90 min. (d) Kaliumcarbonat, MeOH, H_2O, Raumtemperatur, 48 h. (e).

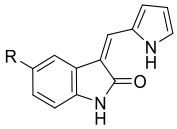
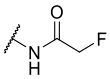
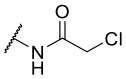
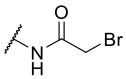
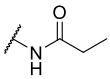
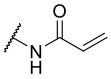
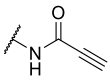
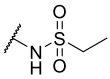
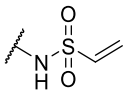
Diese Schutzgruppe vereint verschiedene Vorteile, die sich im Verlauf des Projekts als nützlich erwiesen. Zum einen ist die Gruppe stabil gegenüber stark sauren Bedingungen und damit orthogonal zu einer unter solchen Bedingungen abspaltbaren Schutzgruppe. Zudem könnte eine reduktiv spaltbare Gruppe, wie etwa die Carboxybenzyl (Cbz)-Schutzgruppe, auch zur Reduktion der Indolinon-Doppelbindung führen. Die Abspaltung erfolgt im wässrigen, leicht basischen Milieu. Hierbei reicht bereits Kaliumcarbonat mit einem Kosolvens wie Methanol aus. Das Trifluoracetyl-geschützte 2-Oxindol **2** wurde dann mit einer Knoevenagel-Kondensation, die wiederum in der Mikrowelle durchgeführt wird, zum Indolinon **3** umgesetzt (37% Ausbeute). Die Entschützung des Amins erfolgte in Wasser/Methanol mit Kaliumcarbonat als Base (86% Ausbeute). Die so erhaltenen Amine wurden dann zu den Zielstrukturen umgesetzt. Die elektrophilen Gruppen werden entweder ausgehend von den korrespondierenden Säurechloriden durch Acylierung (**BSc5232**, **BSc5237**, **BSc5233**, **BSc5316**), den freien Säuren mit Peptidkupplungsmethoden (**BSc5236**, **BSc5238**) oder den Sulfonsäurechloriden (**BSc5234**, **BSc5235**) in guten bis moderaten Ausbeuten hergestellt (23% bis 58% Ausbeute). Einen Spezialfall stellte dabei die Synthese des α-Fluoracetamids **BSc5315** dar. Dieses wurde mit einem Überschuss an Kaliumfluorid durch Austausch des Fluorid-Ions mit dem 2-Bromacetamid-Derivat **BSc5316** in 35% Ausbeute hergestellt. Alternative Synthesestrategien wären zum einen die direkte Knoevenagel-Kondensation mit dem 5-Nitro-2-oxindole, wonach die Nitro-Gruppe durch Reduktion zum Amin erhalten wird. Dieser Ansatz könnte für größere Reaktionsansätze unter Verwendung von unedlen Metallen wie Eisen oder Zinn zur Reduktion unter sauren Bedingungen besser geeignet sein. Alternativ können auch Schutzgruppen, die unter sauren Bedingungen abspaltbar sind, verwendet werden, wie die Butoxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe, wobei die Reste demgegenüber stabil sein müssen.

Die für die biochemischen Testungen hergestellten Inhibitoren stehen, nach in der Regel chromatografischer Reinigung, in einer Reinheit von mehr als 95% zur Verfügung, um einerseits eine höchst mögliche Aktivität zu erlauben, aber auch um Artefakte in der Testung durch beispielsweise Nebenprodukte oder Edukte zu verhindern.

Das Vinylsulfonamid **BSc5234** ist der potenteste Inhibitor in dieser Serie und zeigt eine 5-fach höhere zytotoxische Aktivität gegenüber FLT3-abhängigen MV4-11-Zellen (IC_{50} = 67 ± 8 nM) im Vergleich zur reversiblen Grundstruktur (Tabelle 3). Zudem zeigt

diese Struktur die höchste inhibitorische Aktivität gegen die pathologischen FLT3(ITD) (93%) und FLT3(D835Y)-Mutationen (77%) in der Gegenwart von 100 nM Inhibitor. Entscheidend ist der Vergleich mit dem analogen, unreaktiven Inhibitor **BSc5235**. Dieser zeigt einen massiven Verlust an zytotoxischer Aktivität (IC_{50} > 1.000 nM) und Inhibition der Kinase (FLT3(D835Y): 13%, FLT3(ITD): 9%), wodurch ersichtlich wird, dass die Aktivität dieses Inhibitors auf der elektrophilen Wirkung und damit auf der irreversiblen Bindungsbildung beruht, da beide Strukturen den gleichen reversiblen Protein-Ligand-Komplex eingehen können. Die elektrophile Vinylsulfonamid-Gruppe gab zudem die höchste Anzahl der Treffer im virtuellen *Screening*, und liegt, nach Sortierung der aufsteigenden und damit geringeren virtuellen Liganden-Effizienz (LE_V) auf Rang 6 der 102 Treffer (LE_V = -0.55) und weiteren Treffern auf den Rängen 16, 22, 41 und 67 (Kapitel 5.2.1). Das Propargylamid **BSc5238** (IC_{50} > 1.000 nM) und das Acrylamid **BSc5233** (IC_{50} > 1.000 nM) zeigen einen massiven Verlust an zytotoxischer Aktivität gegenüber dem reversiblen Grundgerüst, vergleichbar mit dem strukturell analogen, aber unreaktiven Propansäure-Amid **BSc5236** (IC_{50} > 1000 nM). Für alle drei Inhibitoren ergibt sich zudem nur eine geringe Aktivität gegenüber FLT3(ITD) und FLT3(D835Y). Die 2-Haloacetamid-Derivate zeigen in Kinase-Assays eine vergleichbare Aktivität wie das unsubstituierte Acetamid, während eine leichte Präferenz der Inhibition von FLT3(ITD) durch das 2-Chloracetamid **BSc5237** beobachtet wird. Während das reversible Acetamid-Derivat keine Inhibition der MV4-11 Zellviabilität aufweist (IC_{50} > 1.000 nM), ergibt sich für das 2-Brom- (**BSc5316**, IC_{50} = 653 ± 200 nM) und das 2-Fluor-Derivat (**BSc5315**, IC_{50} = 845 ± 20 nM) eine etwas höhere Aktivität, die jedoch hinter der des reversiblen Grundgerüsts zurückbleibt. Das 2-Chloracetamid-Derivat **BSc5237** zeigt hingegen eine starke, mit **BSc5234** vergleichbare zytotoxische Wirkung (IC_{50} = 72 ± 8 nM).

Tabelle 3. Inhibition der Zellviabilität von MV4-11-Zellen und der FLT3(ITD) und FLT3(D835Y) Kinaseaktivität durch das Indolinon-Fragment **BSc5229** und der daraus abgeleiteten 5-substitutierten Indolinone mit elektrophilen- und den anlogen, unreaktiven Gruppen.

	Verbindung	IC_{50} (MV4-11) / nM	Relative Inhibition / % FLT3(D835Y) c = 0.1 µM	FLT3(D835Y) c = 1 µM	FLT3(ITD) c = 0.1 µM
- H	**BSc5229**	380 ± 21	40	86	61
	**BSc5232**	> 1.000	47	90	33
	**BSc5315**	845 ± 20	57	92	51
	**BSc5237**	72 ± 8	53	87	61
	**BSc5316**	653 ± 200	48	92	21
	**BSc5236**	> 1.000	15	81	44
	**BSc5233**	> 1.000	29	79	25
	**BSc5238**	709 ± 50	5	58	55
	**BSc5236**	> 1.000	13	72	9
	**BSc5234**	67 ± 8	77	96	93

Nachdem die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der elektrophilen Inhibitoren, ihrer reversiblen Analoga und der zugrunde liegenden Grundgerüste evaluiert wurden, kann die entwickelte *Screening*-Strategie in Bezug auf ihre Vorhersagekraft der als aktiv und inaktiv vorhergesagten Treffer untersucht werden und mögliche Verbesserungen in das *Screening*-Protokoll eingearbeitet werden.

Das Propargylamid **BSc5238** wurde im *Screening* nicht als Treffer gefunden und kann somit seine fehlende Aktivität durch eine nicht-vorteilhafte, kovalente Platzierung des Addukts erklären. Das Vinylsulfonamid ergab hingegen 5 Treffer und ist die aktivste

Verbindung der Serie, wobei alle *Docking*-Positionen einen ähnlichen Bindungsmechanismus aufweisen. Dagegen stellt sich die Situation für das 2-Chloracetamid-Derivat **BSc5237** und das Acrylamid **BSc5233** komplizierter dar. Während das Acrylamid als Treffer aus dem *Screening* resultiert und weder in zellulären noch biochemischen Assays eine höhere Aktivität als die reversiblen Grundgerüste zeigte, ist das als negativ hervorgesagte 2-Chloracetamid hoch potent.

Für das Acrylamid **BSc5233** wurde nur eine *Docking*-Konformation nach der Filter-Strategie erhalten (Rang 1, LE_V = -0.61). Aus der Überlagerung der höchst-bewerteten Strukturen für **BSc5233** und dem hoch aktiven Vinylsulfonamid **BSc5234** wird jedoch deutlich, dass diese den gleichen Bindungsmodus eingehen und im *Docking* bioisoster zueinander sind. Somit resultiert die höhere Liganden-Effizienz in **BSc5233** nur durch die zusätzlich Sauerstoffgruppe in der Sulfon-Gruppe von **BSc5234**. Da sich aus den Protein-Liganden-Interaktionen keine Hinweise für eine geringere Aktivität ableiten lassen, wurde die Konformation der isolierten Liganden untersucht. Dazu wird der Rezeptor aus dem Modell entfernt, die Energie des Liganden basierend auf dem Amber10:EHT-Kraftfeld minimiert und das Energieprofile des dihedralen Winkels zwischen der C-C-N-Ebene des aromatischen Amin und der C-N-S-Ebene der elektrophilen Gruppe untersucht (Abbildung 45). Dabei wurde jeweils die am höchsten bewertete *Docking* Position (London dG *Scoring*) analysiert.

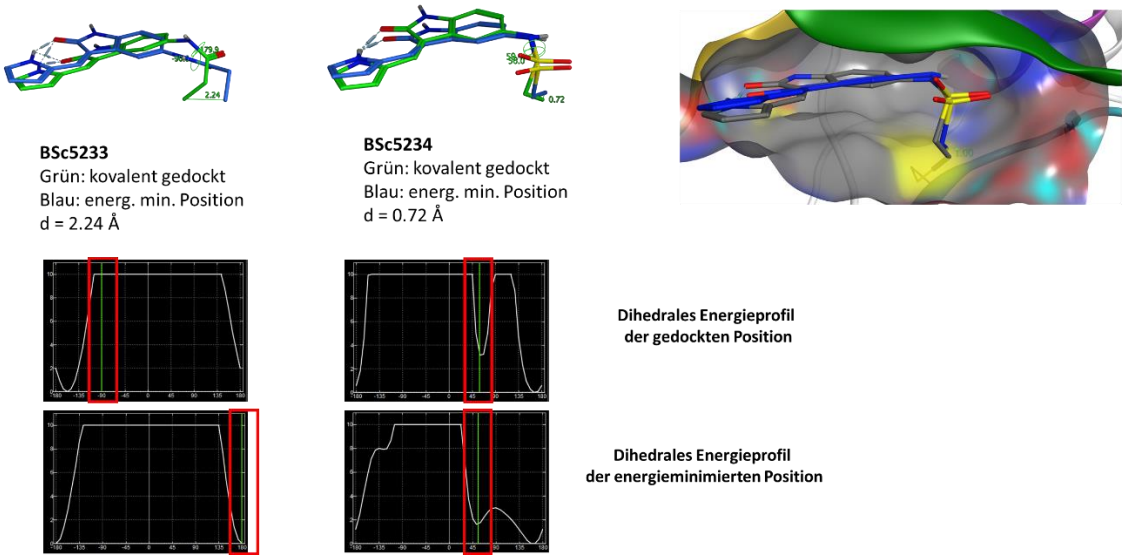


Abbildung 45. Vergleich der modellierten (grün) und Energie-minimierten Konformation (blau) des aktiven Vinylsulfonamid-Derivats **BSc5234** und des inaktiven Acrylamid-Derivats **BSc5233**.

Dabei ist zu erkennen, dass im Vinylsulfonamid **BSc5234** die Energie der reaktiven Gruppe nahe an einem lokalen Minimum liegt und somit ein stabiler, reversibler Komplex eingegangen wird, der eine räumliche Nähe zu Cys828 erlaubt. Zusätzlich wird der dihedrale Winkel durch die Energieminimierung des ungebundenen Liganden nur um 3° (56° zu 59°) geändert und liegt weiterhin im lokalen Energieminimum. Die Position des entfernten, elektrophilen C-Atoms wird dabei um 0.72 Å verschoben, während sich das gesamte Molekül mit einem RMSD-Wert von 0.49 Å ändert. Im Gegensatz dazu wird die Position des distalen C^{γ} in der Acrylamid-Gruppe des inaktiven Derivats **BSc5233** um 2.24 Å und der dihedrale Winkel um 39° verschoben (Gesamt-RMSD: 0.89 Å). Zudem liegt der dihedrale Winkel, der aus der Position nach dem kovalenten *Docking* resultiert, in einem Energiemaximum und erst nach der Energieminimierung in einem Minimum. Diese Konformation würde jedoch mit der Kinase einen sterischen Konflikt erzeugen und erlaubt somit keine vorteilhafte Ausbildung eines reversiblen Komplexes und somit auch keine kovalente Modifikation. Dies erklärt weshalb, trotz der vorteilhaften *Docking*-Position, keine inhibitorische Aktivität festgestellt wurde.

Zusätzlich wurde eine stochastische Konformations-Suche der ungebundenen Inhibitoren durchgeführt, um mögliche Konformationen der Elektrophile und somit eine mögliche Bindungstrajektorien einschätzen zu können (Abbildung 46). Hierbei zeigte sich, das zum einen das Vinylsulfonamid-Elektrophil deutlich mehr stabile Konformationen einnehmen kann als das Acrylamid-Elektrophil (16 statt 8), die zudem deutlich mehr aus der Ebene des Indolinon-Rings heraus zeigen und somit einen *induced fit* an die ATP-Bindetasche von FLT3 erlauben und dadurch auch eine Anpassung an eine größere Anzahl mögliche Trajektorien zur Bindung an Cys828.

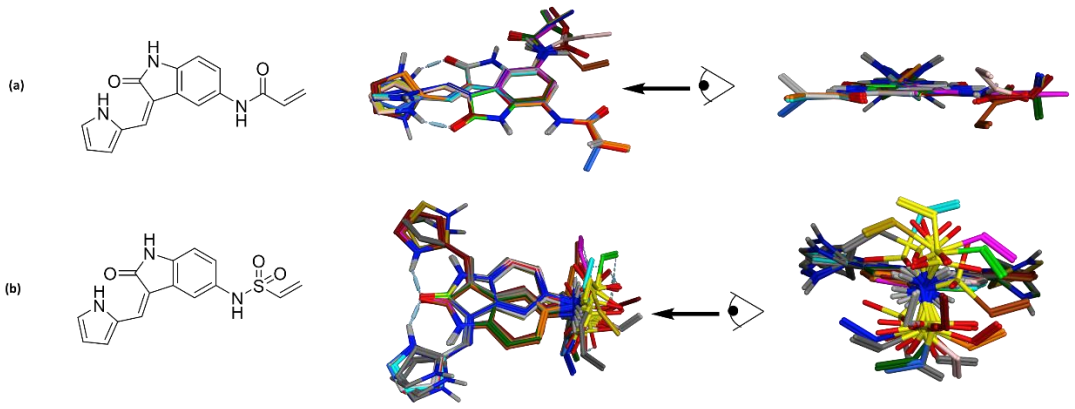


Abbildung 46. Vergleich möglicher, stabiler Konformationen des (a) aktiven Vinylsulfonamid-Derivates **BSc5234** und (b) des inaktiven Acrylamid-Derivats **BSc5233**.

Um die überraschende Aktivität des 2-Chloracetamids zu erklären, wurde ein erneutes *Docking* von **BSc5237** durchgeführt. Da die Acetamid-Gruppe mit 3.8 Å deutlich kürzer ist als die anderen verwendeten Elektrophile (~5 Å) wurde vermutet, dass das ursprüngliche Pharmakophor von 1.5 Å zu stringent ist, um einen *induced fit* aller Inhibitoren an die FLT3 zu ermöglichen. Dazu wurden die Radien der Pharmakophor-Eigenschaften des Indolinon-Grundgerüstes auf 2.0 Å erhöht (Donor, Akzeptor, Aromat), jedoch nicht die von Cys^{828}, und erneut ein kovalentes *Docking* durchgeführt (Abbildung 47). Diese Änderung führte zu mehreren plausiblen *Docking*-Positionen und einer mit **BSc5234** vergleichbaren best-bewerteten Position und zeigt, dass die verwendete *Screening*-Strategie auch eine zuverlässige Modellierung von Inhibitoren mit dem α-Haloacetamid-Elektrophil erlaubt. Die geringere Aktivität der Fluor- und Brom-Derivate **BSc5315** und **BSc5316** resultiert nicht aus sterischen Effekten, sondern ist vermutlich Folge der veränderten elektronischen Eigenschaften des Elektrophils und der Qualität der Abgangsgruppen. Diese kann im Fall von Fluor zu einer hohen Aktivierungsbarriere führen und erlaubt somit keine kovalente Modifikation. Im Fall von Brom kann die zu hohe Reaktivität zur schnellen Inaktivierung durch ubiquitäre Nukleophile, wie zum Beispiel Glutathion führen und die Inhibition durch Adduktbildung damit verhindern. Es existiert zurzeit keine Möglichkeit für eine adäquate Simulierung der kovalenten Inaktivierung von Rezeptor-Nukleophilen durch elektrophile Gruppen; somit wird auch im kovalenten *Docking* nicht nach Art des Halogens unterschieden. Die genauere Analyse der elektronischen Effekte erfolgt im späteren Verlauf dieser Arbeit.

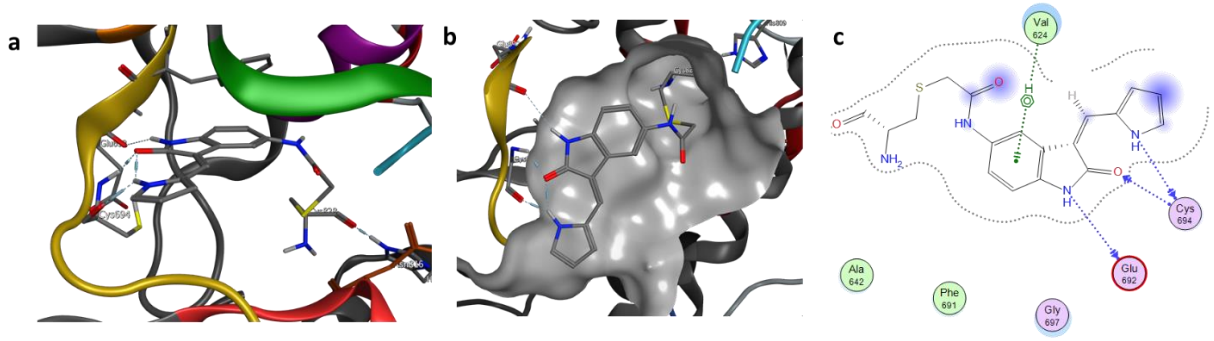
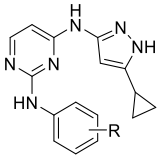
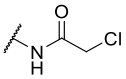
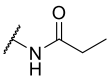
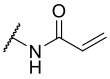
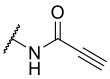
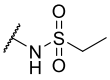
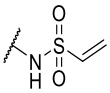


Abbildung 47. Kovalentes *Docking* von **BSc5237** mit dem erweiterten Pharmakophormodell. (a) Position von **BSc5237** in der ATP-Bindungstasche und (b) in der Oberfläche des Rezeptors. (c) Liganden-Interaktionen von **BSc5237**.

3.1.5 Biochemische Evaluierung von Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren

Zur Evaluierung von irreversiblen Inhibitoren des zweiten, hoch potenten, reversiblen Grundgerüsts 3, der Bisaminopyrimidine, wurde in ähnlicher Weise vorgegangen wie bei dem Indolinon-Grundgerüst. Die Synthese der Strukturen, welche aus der virtuellen *Screening*-Strategie resultierten, wurde dabei von Daniel Stubba in der Arbeitsgruppe Schmidt durchgeführt; die biochemische Evaluierung erfolgte im Rahmen dieser Dissertation. Dazu wurden 14 Inhibitoren synthetisiert, die alle vier Elektrophile sowie die analogen, unreaktiven Strukturen beinhalten; sowohl in *meta*-, als auch in *para*-Position (Tabelle 4).

Tabelle 4. Inhibition der Zellviabilität von MV4-11 Zellen und der FLT3(ITD) und FLT3(D835Y) Kinaseaktivität durch das Bisaminopyrimidin-Fragment **BSc5231** und den korrespondierenden 3- und 4-substituierten Inhibitoren **BSc5300** – **BSc5314** mit chemisch reaktiven Gruppen oder den analogen, unreaktiven Gruppen.

	Verbindung	Substitution	IC_{50} (MV4-11) / nM	Relative Inhibition / % FLT3(D835Y) c = 0.1 µM	Relative Inhibition / % FLT3(D835Y) c = 1 µM	Relative Inhibition / % FLT3(ITD) c = 0.1 µM
-H	**BSc5231**	-	230 ± 53	52	88	27
	**BSc5300**	3	> 1.000	36	85	54
	BSc5303	4	> 1.000	45	86	82
	**BSc5306**	3	175 ± 2	33	90	74
	BSc5307	4	141 ± 13	39	93	74
	**BSc5301**	3	> 1.000	37	90	66
	BSc5304	4	> 1.000	34	80	22
	**BSc5302**	3	787 ± 100	22	81	50
	BSc5305	4	521 ± 65	29	84	59
	**BSc5314**	3	> 1.000	38	58	2
	BSc5313	4	> 1.000	45	54	17
	**BSc5309**	3	489 ± 17	32	92	59
	BSc5310	4	129 ± 16	72	96	86
	**BSc5311**	3	2.3 ± 0.1	47	90	73
	BSc5312	4	58 ± 16	86	95	99

Aufgrund der geringen zellulären Aktivität der 2-Fluor- und 2-Bromacetamid-Derivate bei der Optimierung der Indolinon-basierten FLT3-Inhibitoren wurden in diesem Teilprojekt nur die 2-Chloracetamid-Derivate hergestellt und evaluiert.

Ähnlich zu den Ergebnissen der Indolinon-basierten FLT3-Inhibitoren zeigten die Vinylsulfonamid-Derivate des Grundgerüsts aus **BSc5231** eine massiv gesteigerte zytotoxische Wirkung (**BSc5312**: IC_{50} = 58 ± 16 nM; **BSc5311**, IC_{50} = 2.3 ± 0.1 nM), während die analogen, unreaktiven Inhibitoren eine vergleichbare zytotoxische Wirkung wie **BSc5231** in MV4-11-Zellen aufweisen (**BSc5309**: IC_{50} = 489 ± 17 nM; **BSc5310**: IC_{50} = 129 ± 16 nM). Die Inhibition der FLT3(ITD) (**BSc5311**: 73%, **BSc5309**: 59%; **BSc5312**: 99%, **BSc5310**: 86%) und FLT3(D835Y)-Mutationen (**BSc5311**: 47%, **BSc5309**: 32%; **BSc5312**: 86%, **BSc5310**: 72%, jeweils 100 nM Inhibitor) zeigt einen ähnlichen Anstieg in der Inhibition durch das elektrophile Derivat wie bei den Indolinon-Derivaten. Interessanterweise zeigt sich durch **BSc5311** eine niedrigere Inhibition von FLT3(ITD) als durch **BSc5312**, aber eine ca. 25-fach höhere zytotoxische Wirkung in der FLT3-ITD-abhängigen Zelllinie. Dies lässt sich möglicherweise auf synergistische Inhibition von *off target*-Kinasen zurückführen und wird im späteren Verlauf der Arbeit vertieft. Die korrespondierenden 3-Methyl-Derivate, die ursprünglich modelliert wurden, ergaben für die in *meta*- und *para*-substituierten Vinylsulfonamide zwei (Rang 51, 96) bzw. drei Treffer (Rang 17, 54, 83) und sind auch durch *Redocking* von **BSc5311** und **BSc5312** in das FLT3-DFG-*in* Homologie-Modell identifiziert worden. Damit zeigt sich, dass auch für das Bisaminopyrimidin-Grundgerüst eine prädiktive kovalente Modellierung mit der in dieser Arbeit entwickelten *Screening*-Strategie möglich ist.

Die Acrylamid-substituierten Derivate zeigen keine vorteilhafte zytotoxische Wirkung verglichen mit dem reversiblen Inhibitor **BSc5231** (**BSc5302**, IC_{50} = 787 ± 100 nM; **BSc5305**, IC_{50} = 521 ± 65 nM), während die analogen reversiblen Inhibitoren **BSc5301** und **BSc5304** nahezu inaktiv sind (IC_{50} > 1000 nM). Im virtuellen *Screening* wurden diese Strukturen auch nur als niedrig-gereihte Verbindungen erhalten (**BSc5302**: Rang 99, **BSc5305**: Rang 49 und 101 von 102). Die *meta*- und *para*-substituierten Propargylamide sind die am wenigsten aktiven Verbindungen der Serie und zeigen nur vernachlässigbare zytotoxische Wirkung in MV4-11-Zellen (IC_{50} > 1000 nM). Das *para*-substituierte Derivat **BSc5313** ergab keine Position im kovalenten

Docking, während das *meta*-substituierte Derivat **BSc5314** in zwei Positionen gefunden wurde (Ränge 10 und 45).

Durch dieses Grundgerüst wird deutlich, dass die Propargylamide von diesem *Screening*-Ansatz nicht profitieren. So erlaubt die sp-Hybridisierung des Alkins nur eine gänzlich andere Konformation (180°) als das sp^2-hybridisierte Addukt, welches modelliert wurde. Somit wurde eine starke Änderung der Konformation des reversibel bindenden Liganden ausgelöst. Dieses Problem tritt insbesondere bei den Vinylsulfonamiden und den α-Haloacetamiden in dieser Studie nicht auf, da die Konformation im kovalent verbundenen Zustand in ihrem Prinzip auch in der reversiblen, initialen Konformation möglich ist.

Die reversible Acetamid-Struktur führt zu einer verringerten zytotoxischen Aktivität sowohl in *meta*- (**BSc5300**, $IC_{50} > 1000$ nM) als auch in *para*-Position (**BSc5303**, $IC_{50} > 1000$ nM), während die 2-Chloracetamid-Substitution zu einer leicht erhöhten zytotoxischen Wirkung im Vergleich zu **BSc5231** führt (**BSc5306**, $IC_{50} = 175 \pm 2$ nM; **BSc5307**, $IC_{50} = 141 \pm 13$ nM) und auf einen kovalenten Bindungsmechanismus hinweist. Die Inhibition der FLT3(ITD) und der FLT3(D835Y) Mutanten ist vergleichbar zu den reversiblen Acetamiden **BSc5300** und **BSc5303**.

3.1.6 Analyse der Vorhersagekraft

Bezogen auf die Anzahl der Positionen im *Docking* der einzelnen Derivate ergaben sich für aktive Verbindungen 16 (73%) und für inaktive Verbindungen sechs Positionen (27%) aus dem kovalenten *Screening* (Tabelle 5). Dabei wurden alle Vinylsulfonamid-Derivate als Treffer validiert (3 Verbindungen, 10 *Docking*-Positionen).

Tabelle 5. Übersicht der Ergebnisse des virtuellen *Screening*.

	Aktive Verbindungen			Inaktive Verbindungen	
	Anzahl der Positionen im *Docking*	Interpretation		Anzahl der Positionen im *Docking*	Interpretation
BSc5311	2	*Richtig-Positiv*	**BSc5238**	0	*Richtig-Negativ*
BSc5312	3	*Richtig-Positiv*	**BSc5233**	1	*Falsch-Positiv*
BSc5234	5	*Richtig-Positiv*	**BSc5302**	1	*Falsch- Positiv*
BSc5237	0	*Falsch-Negativ*	**BSc5305**	2	*Falsch- Positiv*
BSc5307	5	*Richtig-Positiv*	**BSc5313**	0	*Richtig-Negativ*
BSc5306	1	*Richtig-Positiv*	**BSc5314**	2	*Falsch- Positiv*
Summe	**16**		**Summe**	**6**	

Interessanterweise ist die Anzahl falsch-positiver Treffer deutlich höher als die Anzahl falsch-negativer Treffer. Ein möglicher Grund liegt in der großen Variation zwischen dem modellierten, kovalenten Protein-Ligand-Komplex und des reversiblen, der Inaktivierung vorgelagerten Protein-Ligand-Komplexes, der nicht modelliert wird. Deshalb sollte zusätzlich die Plausibilität der Konformation des kovalenten Komplexes, wie für die Derivate **BSc5233** und **BSc5234** bestimmt werden. Zudem wurde das vergrößerte Pharmakophor für die kovalente Modellierung von **BSc5237** erfolgreich eingeführt. Diese Variation und die erneute Bestimmung der Trefferwahrscheinlichkeit sollten im Rahmen eines neuen Projektes erfolgen, um die unvoreingenommene Vorhersage vor der biochemischen Testung vorherzusagen.

3.1.7 Optimierung der *Screening*-Treffer BSc5234 und BSc5237

3.1.7.1 Strukturbasiertes Design

Da das Design der kovalent bindenden Fragmente ausgehend von optimierten Leitstrukturen fragmentiert wurde, sollten diese Strukturmotive wieder in die kovalent bindenden Fragmente eingeführt werden, um die Inhibition von FLT3 und die zytotoxische Aktivität in FLT3-mutierten Zelllinien zu erhöhen. Das Bisaminopyrimidin-Grundgerüst ist für diesen Zweck weniger geeignet, da zum einen die Molekülmasse deutlich höher ist als im Indolinon-Grundgerüst, aber auch sehr wahrscheinlich eine promisken Kinase-Aktivität durch die Pyrazolylamin-Gruppe vorliegt. Dies zeigt sich an der Inhibition der weit entfernten Kinasen GSK3α und GSK3β bei welchen ebenfalls ein Cystein vor dem DFG-Motiv vorliegt (GSK3α: Cys262; GSK3β: Cys199). Sowohl das reversible Methyl-substituierte Derivat **BSc5224** (GSK3α: 47%; GSK3β: 50%) als auch das Cyclopropyl-substituierte Derivat **BSc5231** (GSK3α: 74%; GSK3β: 76%) zeigen eine potente Inhibition bei 1 µM Inhibitor, während die reversiblen Indolinone nur eine vernachlässigbare Inhibition aufweisen (-10% bis 12%, Tabelle 2). Zudem ist die zytotoxische Aktivität des *meta*-substituierten Vinylsulfonamids **BSc5311** ca. 25-fach höher als die des *para*-substituierten Derivats, während die Inhibition von FLT3(ITD) und FLT3(D835Y) den umgekehrten Trend aufzeigt. Dies lässt vermuten, dass die zytotoxische Wirkung hauptsächlich von synergistischen Effekten durch die Inhibition von anderen Kinasen hervorgerufen wird. Zudem zeigen sowohl **BSc5311** als auch

BSc5312 starke zytotoxische Wirkung in den nicht von FLT3-abhängigen THP1- und Jurkat-Zelllinien. Zusätzlich ist die zellbasierte Liganden-Effizienz in MV4-11-Zellen der Indolinon-Derivate **BSc5237** (-0.34) und **BSc5234** (-0.33) deutlich höher als die der Bisaminopyrimidin-Derivate **BSc5311** (-0.29) und **BSc5312** (-0.26), wobei diese als das Verhältnis des pIC_{50} und der Anzahl der nicht-Wasserstoff-Atome definiert ist. Ein weiterer Vorteil der Indolinon-Struktur ist, dass die Kernstruktur des kovalenten *Docking* von **BSc5237** und **BSc5234** eine gute Übereinstimmung mit der Konformation von Sunitinib in der ATP-Bindetasche von cKIT (PDB: 3G0E)[114] und VEGFR2 (PDB: 4AGD)[115] aufweist (Abbildung 48a), wobei eine Verschiebung des Grundgerüsts aus der leicht unterschiedlichen Position der überlagerten Kinasen zurückgeführt werden kann. Bei der Analyse der Strukturen wird deutlich, dass das 3-Kohlenstoff-Atom des Pyrrols zur Solvens-Seite der ATP-Bindetasche exponiert ist (Abbildung 48b) und somit eine Hybridisierung mit dem ursprünglichen **Sunitinib** ermöglicht wird. Dabei werden an der 2- und der 4-Position des Pyrrol-Rings eine Methyl-Gruppe eingeführt und an der 3-Position über eine Carboxamid-Gruppe eine Löslichkeits-vermittelnde, basische Diethylethylendiamin-Gruppe eingeführt (Abbildung 48c). Dadurch entstehen die Hybrid-Strukturen **BSc5318** (Abbildung 48d, e) und **BSc5371** (Abbildung 48f, g). Die Einführung der 4-Methyl-Gruppe nahe des Cys694 ändert die Position der Sulfonamid-Gruppe leicht, wodurch eine starke Donor-Akzeptor-Wechselwirkung eines Sulfon-Sauerstoff-Atoms mit der positiv geladenen Lys644-Seitenkette der konservierten Salzbrücke erlaubt wird (Abbildung 48g). Das kovalente *Docking* von **BSc5371** und **BSc5318** wird mit den optimierten *Docking*-Parametern des ersten Teils dieser Arbeit durchgeführt (2.0 Å Liganden-Pharmakophor). Die Rezeptor-freie Energie-Minimierung der Liganden zeigt, ähnlich wie für die Indolinone-Fragmente, nur eine geringe Abweichung des Abstands des Vinyl-C^{β}-Atoms von 1.12 Å zur Konformation in der kovalent modellierten Bindungsmodus während das Energiediagramm des dihedralen Winkels nahe an einem lokalen Energieminimum liegt (Abbildung 49a). Die höchst-bewerteten *Docking*-Positionen von **BSc5318** und **BSc5371** zeigen einen vergleichbaren Bindungsmodus mit **Sunitinib** in cKIT und VEGFR2 (Abbildung 49b, c). Die Konformation der Solvens-exponierten Diethylamin-Gruppe ist, wie aus der Analyse der gelösten Kokristallstrukturen verschiedener Kinasen mit **Sunitinib** deutlich wird, hoch flexibel (Abbildung 49d).

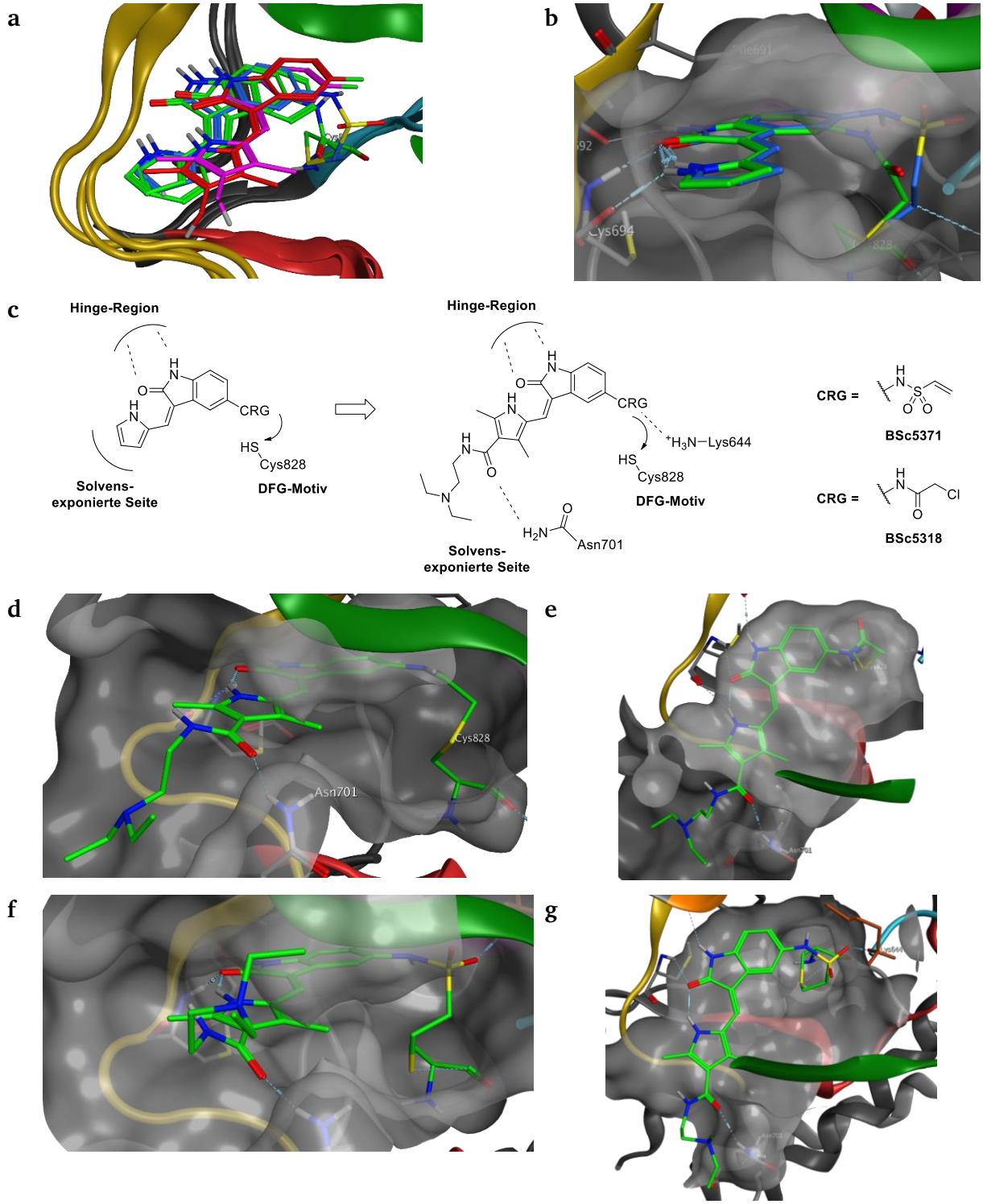


Abbildung 48. (a) Überlagerung der Indolinon-Kernstruktur von **Sunitinib** (rot, violett) und **BSc5237** (grün) und **BSc5234** (blau) sowie (b) Exposition des Pyrrol-Rings in den Indolinon-Fragmenten zur Solvens-exponierten Seite der ATP-Bindungstasche von FLT3. (c) Strategie zur Entwicklung von **Sunitinib**-Hybridstrukturen und Schlüsselinteraktionen. Frontalansicht und Aufsicht des kovalentes *Docking* von (d, e) **BSc5318** und (f, g) **BSc5371**.

Interessanterweise zeigt sich hierbei auch, dass die Konformation der Kinase nach Bindung von **Sunitinib** nicht klar determiniert ist und sowohl von der Kinase als vermutlich auch den experimentellen Bedingungen der Kristallisation abhängt (Abbildung 49e). So besetzt **Sunitinib** weder die hydrophobe Tasche II der Kinase, in der typischerweise ein Aryl-Motiv eines Typ II-Inhibitors wie **Sorafenib** liegt, noch die Ribose-Bindetasche der Kinase, wie für beispielsweise **Staurosporin** und **Midostaurin** bekannt. Somit kann eine duale Typ I/II-Inhibition vorliegen, da das adressierte Cystein durch die Regulierung und Konformationsänderung des DFG-Motivs in seiner Position nicht beeinflusst wird.

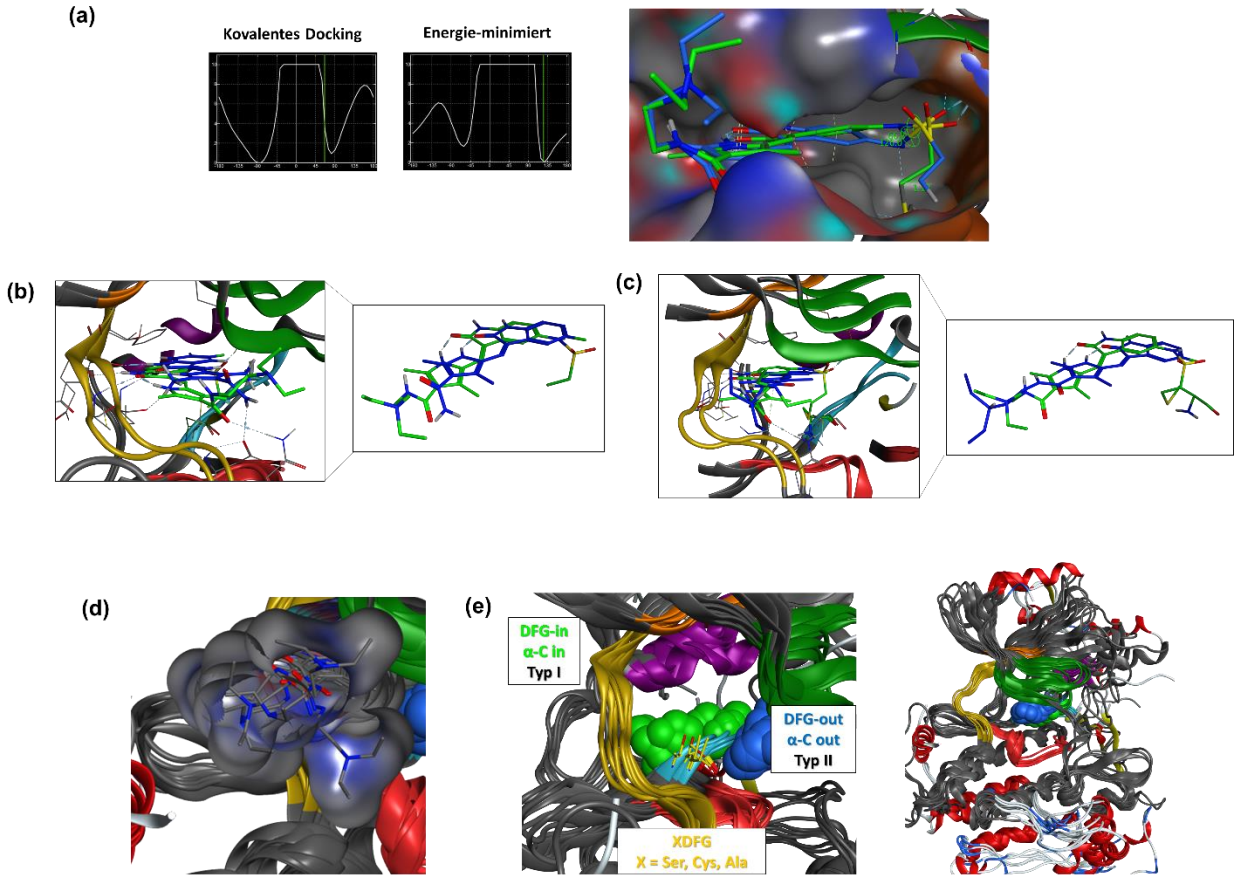
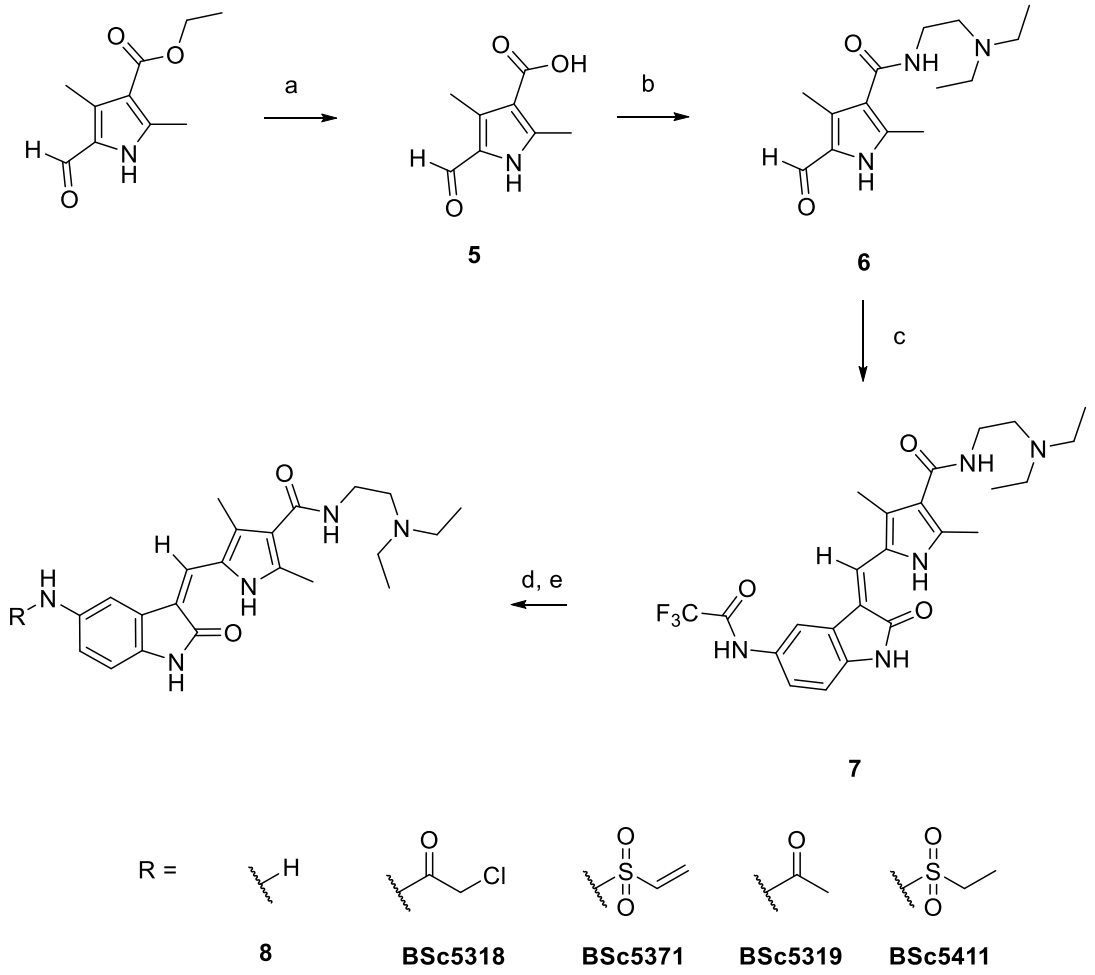


Abbildung 49. (a) Struktur der kovalent-gedockten (grün) und der anschließend energie-minimierten Position (blau) von **BSc5371** in dem FLT3-DFG-*in* Homologie-Modell. Überlagerung von **BSc5371** mit (b) Sunitinib in KIT (PDB: 3G0E) und (c) **Sunitinib** in VEGFR2 (PDB: 4AGD). (d, e) Überlagerung verschiedener **Sunitinib**-Kinase Kristallstrukturen in der DFG-*in*- und DFG-*out*-Konformation.

3.1.8 Synthese von elektrophilen Sunitinib-Hybridstrukturen

Die Synthese der Leitstrukturen erfolgte ähnlich der Synthese im ersten Teil dieser Dissertation. Die Pyrrol-3-carbonsäure **5** wurde durch Verseifung des kommerziell verfügbaren, korrespondierenden Ethylesters in 97% Ausbeute hergestellt (siehe Kapitel 5.2.3.14 ff). Die *N,N*-Diethylethylendiamin-Gruppe wurde anschließend mit einer Standard-Peptidkupplung durch Aktivierung der Säure mit dem Carbodiimid EDAC und Bildung des HOBt-Aktivesters unter basischen Bedingungen mit dem korrespondierenden Amin eingeführt, wobei das Amid **6** in 80% Ausbeute entstand.



Schema 2. Synthese der Sunitinib-hybridisierten Inhibitors. (a) Kaliumhydroxid, MeOH, Wasser, 70°C, 4 h. (b) HOBt, EDAC, DMF, Raumtemperatur, 20 min; dann Triethylamin, *N,N*-Diethylethylendiamin, Raumtemperatur, über Nacht. (c) **2**, kat. Piperidin, EtOH, Mikrowelle, 130°C, 90 min. (d) Kaliumcarbonat, Wasser, MeOH, Raumtemperatur, 3 Tage. (e) Säurechlorid oder Sulfonsäurechlorid, Base.

Dieses wurde mit dem Trifluoracetyl-geschützten 2-Oxindol **3** in einer Knoevenagel-Reaktion umgesetzt, wobei das Produkt **7** in 44% Ausbeute erhalten wurde. Die Trifluoracetyl-Schutzgruppe wurde anschließend durch leicht basische Bedingungen abgespalten, wobei das Amin **8** in 54% Ausbeute erhalten wurde. Dieses diente dann als Ausgangstruktur für die divergente Synthese der verschiedenen irreversiblen und analogen reversiblen FLT3-Inhibitoren. Die Synthese erfolgt dabei mit den korrespondierenden Säurechloriden bzw. Sulfonsäurechloriden in 32% bis 61% Ausbeute.

3.1.9 Pharmakologische Evaluierung der elektrophilen Sunitinib-Hybridstrukturen

Die Vinylsulfonamid-Leitstruktur **BSc5371** zeigt eine massiv erhöhte zytotoxische Aktivität in der FLT3(ITD)-positiven MV4-11-Zelllinie (IC_{50} = 6.0 ± 0.3 nM, Tabelle 6) im Vergleich zum korrespondierenden, irreversiblen Fragment **BSc5234**. Das analoge, nicht-elektrophile Fragment **BSc5411** zeigt eine ~100-fach niedrigere zytotoxische Aktivität (IC_{50} = 643 ± 95 nM). Außerdem ist die Inhibition von FLT3(D835Y) durch **BSc5371** (95%) im Vergleich zu **Sunitinib** (82%) und **BSc5411** (32%) bei 100 nM Inhibitor deutlich erhöht.

Die Optimierung des elektrophilen Fragments **BSc5237** zur Hybridstruktur **BSc5318** (IC_{50} = 21 ± 1 nM) führt zu einer ~3-fachen stärkeren zytotoxischen Wirkung in MV4-11-Zellen. Das analoge, unreaktive Acetyl-Derivat **BSc5319** ist hingegen inaktiv und zeigt keine zytotoxische Wirkung (IC_{50} > 1000 nM). Sowohl **BSc5371** (10-fach) als auch **BSc5318** (2.5-fach) zeigen eine deutlich größere zytotoxische Wirkung in MV4-11-Zellen als **Sunitinib** (IC_{50} = 54 ± 1 nM) und erhalten die selektive zytotoxische Wirkung auch gegenüber nicht von FLT3-abhängigen Zelllinien. Ein wichtiger Vergleich ist hier die Aktivität zum einen in FLT3*wt*-Zellen, in denen zwar FLT3 exprimiert wird, aber kein Onkogen ist (THP1, NOMO1, U937) und in FLT3-negativen Jurkat-Zellen (IC_{50} = 300 nM–1000 nM, Kapitel 5.3.2.2 – 5.3.2.4). In FLT3(ITD)-positiven MOLM14-Zellen ist **BSc5371** (IC_{50} = 7.8 nM) stärker zytotoxisch als **BSc5318** (IC_{50} = 26.4 nM) und **BSc5311** (IC_{50} = 11.6 nM).

BSc5371 ist zudem stärker zytotoxisch aktiv in MV4-11-Zellen als der zur Behandlung der FLT3-mutierten AML zugelassene Multikinase-Inhibitor Midostaurin (2-fach; IC_{50} = 10 ± 1 nM) sowie der in der klinischen Phase III untersuchte Inhibitor der Rezeptor-

Tyrosinkinase der Familie III, **Crenolanib** (~2x; IC_{50} = 12 ± 3 nM) und der ebenfalls kovalent an Cys^{828} bindende Naturstoff **Hypothemycin** (~2.5-fach; IC_{50} = 15 ± 3 nM).

Der drastische Unterschied in der Aktivität der reversiblen und irreversiblen Inhibitoren stellt somit einen wichtigen Hinweis für eine kovalente Modifikation von FLT3 dar. Zudem ist die Modifikation an den 3-, 4- und 5-Positionen des Pyrrol-Rings, wie im kovalenten *Docking* vorhergesagt, mit dem kovalenten Wirkungsmechanismus vereinbar und eine Substitution in der Solvens-exponierten Seite der ATP-Bindungstasche wird durch die Kinase toleriert.

Tabelle 6. Inhibition der Zellviabilität ausgewählter Inhibitoren in FLT3-mutierten (MV4-11), FLT3wt (THP1) and FLT3-negative (Jurkat) Zellen nach 72 h Behandlung. Die Inhibition der Kinaseaktivität wurde bei 100 µM ATP und 30 min Vorinkubationszeit von Kinase und Inhibitor mit dem ADP Glo Assay bestimmt. [a] = Halbwertszeit der Verbindung gegenüber 100-fachem Überschuss an reduziertem Glutathion und 10 µM Inhibitor mittels HPLC-Bestimmung. *n.b.* = nicht bestimmt.

Verbindung	IC_{50} / nM			Relative Inhibition / %			$t_{1/2\,/\,min}$[a]
	MV4-11 (FLT3(ITD))	THP1 (FLT3wt)	Jurkat (FLT3 neg.)	FLT3(D835Y) c = 0.1 µM	FLT3(D835Y) c = 1 µM	FLT3(ITD) c = 0.1 µM	
BSc5318	21 ± 1	> 1 µM	> 1 µM	71	90	73	218
BSc5319	> 1 µM	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*
BSc5371	6.0 ± 0.3	> 1 µM	> 1 µM	95	100	86	51
BSc5411	643 ± 95	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*	*n.b.*
BSc5311	2.3 ± 0.1	172 ±24	44 ± 5	47	90	73	58
BSc5312	58 ± 16	514 ± 8	298 ± 10	86	95	99	82
Sunitinib	54 ± 1	> 1 µM	> 1 µM	82	96	70	*n.b.*
Hypothemycin	15 ± 3	> 1 µM	> 1 µM	85	92	91	*n.b.*
Crenolanib	12 ± 3	> 1 µM	> 1 µM	95	100	97	*n.b.*

3.1.10 Untersuchung der Protein-Expression und Phosphorylierung mittels Western-Blots

Um die Stärke und Selektivität der Inhibition in FLT3(ITD)-mutierten MV4-11-Zellen einzuschätzen wurde die Phosphorylierung der am stärksten zytotoxischen Substanzen (**BSc5371**, **BSc5318**, **BSc5311**) mittels Western-Blots durch Anjali Cremer in der Gruppe von Prof. Dr. Kimberly Stegmaier (*Dana Farber Cancer Institute*, Boston, MA, USA) untersucht und die Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Dazu wurden MV4-11 Zellen für 1 h mit Inhibitor behandelt und anschließend lysiert, die Proteine extrahiert und diese mittels SDS-PAGE getrennt. Durch Auftragung auf eine PVDF-Membran in einem Western-Blot Experiment und Inkubation mit Primär-Antikörpern wurden die Expressionslevel von FLT3 und dem Downstream-Effektor STAT5, sowie das Level der Phosphorylierung von FLT3 und STAT5 untersucht. Als Kontrolle für die Auftragung wurde GAPDH verwendet (Kapitel 5.3.1.4). Die Inhibition der FLT3-Kinase und damit die Autophosphorylierung der Kinase und Phosphorylierung des Effektors STAT5 ist für **BSc5371** deutlich stärker als für **BSc5318** und korreliert mit der zytotoxischen Aktivität. Für **BSc5311** ist die Inhibition der Phosphorylierung trotz der starken zytotoxischen Aktivität deutlich geringer, die erst bei einer Inhibitor-Konzentration von 30 nM beobachtbar ist. Die Doppelbande von FLT3 kommt zustande, da sowohl die glykosylierte als auch die freie Variante der FLT3 in den Zellen vorliegt und beide durch den pFLT3-Antikörper gebunden werden.

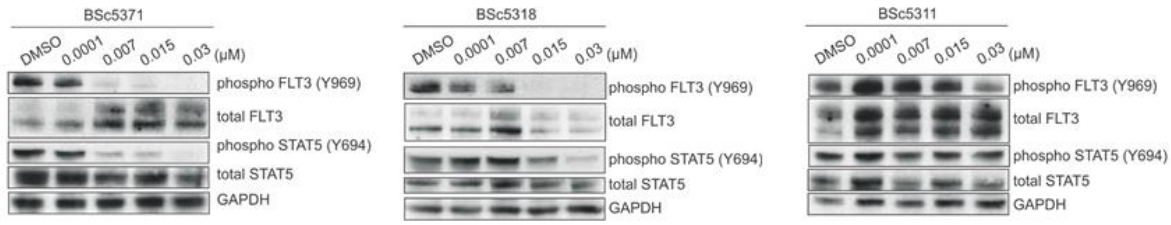


Abbildung 50. Western-Blot Analyse von sowohl phosphorylierten (*phospho*) als auch gesamt (*total*) -FLT3 und STAT5-Leveln und GAPDH Ladekontrolle.

3.1.11 Bestimmung der Selektivität gegenüber verschiedenen Kinasen

Die Selektivität der FLT3-Inhibition des aktivsten Inhibitors **BSc5371** gegenüber 32 weiteren Kinasen wurde durch die KinaseProfiler-Plattform bei einer Konzentration von 100 nM Inhibitor bestimmt (Abbildung 51, Eurofins Discovery Services, Dundee, UK). Die Kinasen, deren Inhibition getestet wurde, wurden anhand einer bekannten, starken Inhibition durch **Sunitinib** ausgewählt Tabelle 7).[110] Dabei wurden insbesondere Kinasen eingeschlossen, die entweder das konservierte Cystein vor dem DFG-Motiv exprimieren, oder solche, die durch **Sunitinib** stark inhibiert werden, aber an dieser Stelle das ebenfalls nukleophile Serin oder Threonin, oder die kleineren, nicht-reaktiven Glycin oder Alanin in dieser Position besitzen. Die relative Sequenz-Homologie und -Identität der getesteten Kinasen zu FLT3 wurde durch eine Überlagerung bekannter Kinase-Strukturen mit dem FLT3-DFG-*in* Homologie-Modell bestimmt (Abbildung 51a). Die Inhibitionsstärke gegenüber Kinasen verschiedener Unterfamilien wurde mit einem Kinase-Dendrogramm dargestellt (KinMap, Abbildung 51b).[93] Wie erwartet, wurden FLT3wt (95%) und FLT3(D835Y) (99%) stark inhibiert, wobei die stärkere Inhibition der D835Y-Mutation wiederum ein Hinweis auf die Inhibition in der aktiven Kinase-Form und zudem die stärkste Inhibition gegenüber allen getesteten Kinasen darstellt. Überraschenderweise wurden andere Kinasen der PDGF-Rezeptor-Familie, die ebenfalls das konservierte Cystein vor dem DFG-Motiv enthalten, deutlich weniger inhibiert. Dies ist umso bemerkenswerter, als dass **Sunitinib** ähnlich hohe Affinität (nano- bis pikomolarer K_d-Wert) zu diesen Kinasen wie zu FLT3 hat und außerdem eine hohe Sequenz-Homologie (ca. 70%) und -Identität (ca. 55%) aufweist. Dazu gehören cKIT (34% Inhibition), auf Basis dessen Struktur das Homologie-Modell entwickelt wurde, sowie PDGFRα (24%) und PDGFRβ (14%). Die deutlich weniger homologen Kinasen (30% bis 40% Homologie) ERK1, ERK2, GSK3α und GSK3β werden bei 100 nM **BSc5371** nicht inhibiert, obwohl sie, ebenso wie FLT3, molekulare Ziele von **Hypothemycin** sind. Außerdem ergibt sich durch die starke Inhibition der Ret-Kinase ein Anhaltspunkt dafür, dass möglicherweise auch ein Serin in dieser Position angegriffen werden kann, da diese Kinase sehr stark inhibiert wird (96%). Interessanterweise wurden 5-Aminoindolinone bereits als potente Ret- und FLT3-Inhibitoren in der Literatur beschrieben und für die Ret-Kinase bereits eine

Kokristallstruktur gelöst (Abbildung 51c, d).[217] Die Überlagerung der konservierten Indolinon-Grundstruktur in **BSc5371** und des Ret-Kinase-Inhibitors **9** zeigt eine hohe Ähnlichkeit des Bindungsmodus (RMSD = 0.7 Å) und stellen somit einen weiteren Beleg für die hohe Qualität der molekularen Modellierung dar.

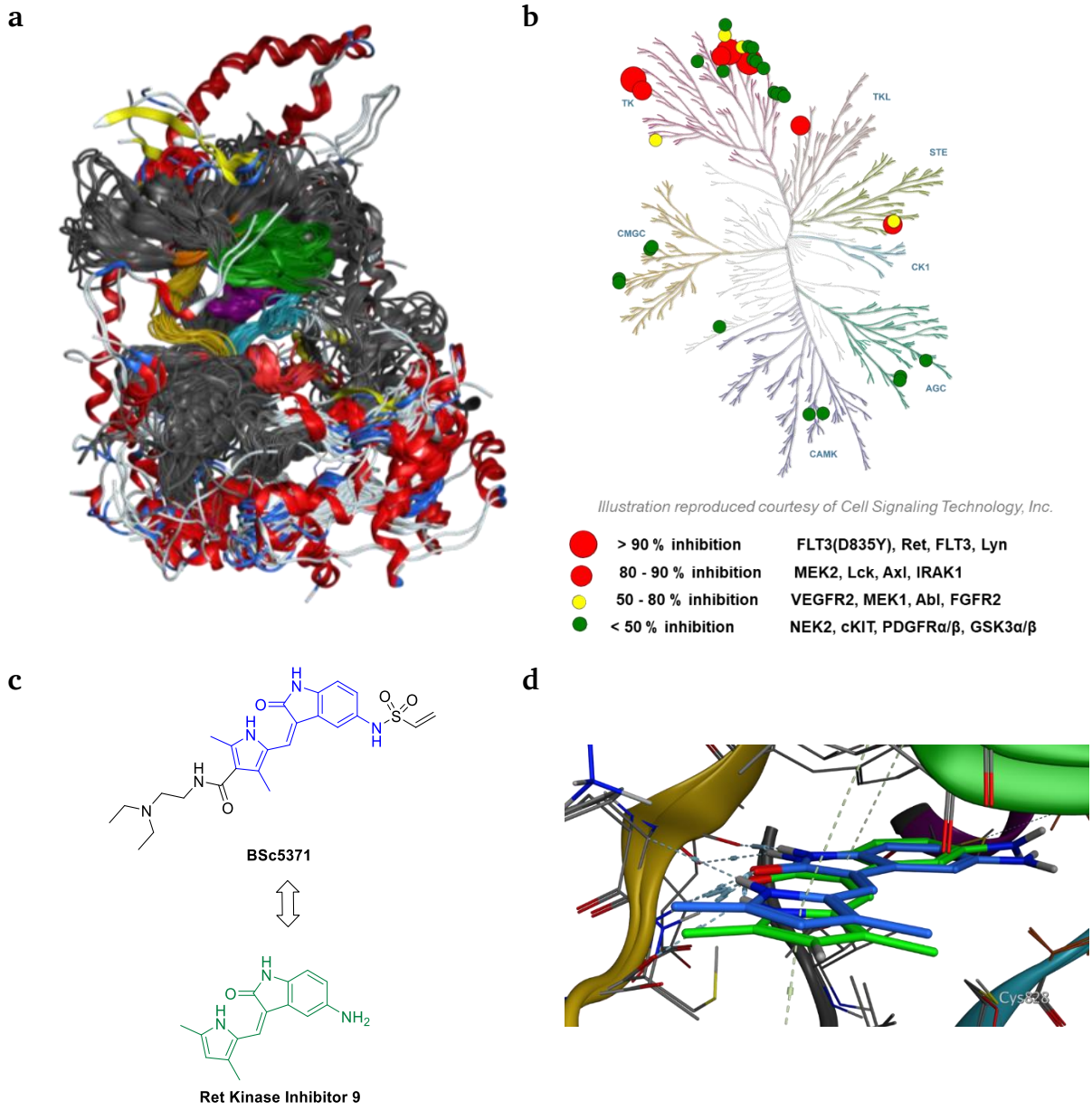


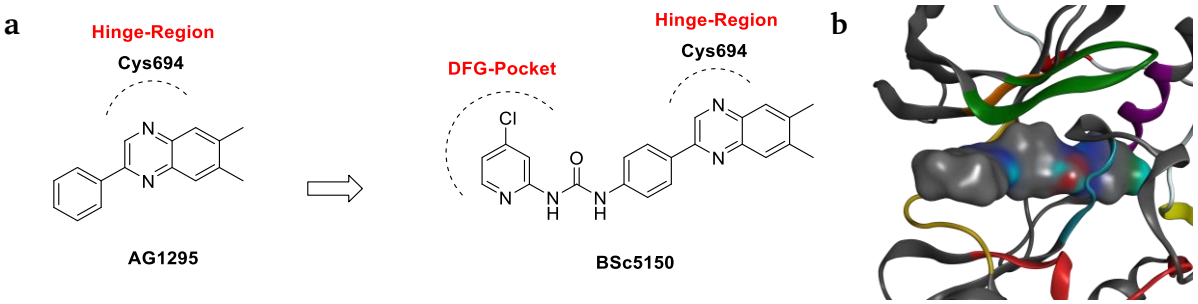
Abbildung 51. (a) Überlagerung der Konformation verschiedener Kinasen mit verfügbarer Struktur in der PDB (Tabelle 7). (b) Selektivität von **BSc5371** in einer Auswahl von 34 Kinasen (Eurofins *KinaseProfiler*, 100 nM Inhibitor, 10 µM ATP; Darstellung mit *KinMap*[93]). (c) Vergleich der Strukturen von **BSc5371** und dem Ret-Kinase-Inhibitor **9** sowie (d) Überlagerung der Bindungshypothese von **BSc5371** und der Kokristallstruktur von dem Kinase Inhibitor **9** mit der aktiven, phosphorylierten Ret-Kinase (PDB: 2X2K).

Die homologen Alanin und Glycin-Reste werden durch **BSc5371** toleriert (Lyn, Lck, Axl, IRAK1; 93% bis 81% Inhibition), was darauf schließen lässt, dass die Wasserstoff-Brückenbindungen mit dem konservierten Lysin der Salzbrücke in der Kinase-Architektur für eine hohe Affinität sorgen, wenn ein sterischer Konflikt beziehungsweise eine Inaktivierung von CysS$^{\gamma}$ oder SerO$^{\gamma}$ nicht vorliegt.

Tabelle 7. Restaktivität von 34 verschiedenen Kinasen nach Inkubation mit **BSc5371** (100 nM, Eurofins KinaseProfiler). Zusätzlich sind die farblichen Anmerkungen in der KinMap (Abbildung 51b) sowie die in der Literatur beschriebenen K_d-Werte für **Sunitinib** angegeben. Die Sequenzidentität und Sequenzhomologie wurden nach Überlagerung verfügbarer PDB-Strukturen mit MOE 2014.09 bestimmt. *n.v.* = nicht verfügbar.

Kinase	Restaktivität bei 0.1 µM BSc5371 / %	Anmerkung	XDFG	Sequenz-identität / %	Sequenz-homologie / %	Sunitinib K_d / nM
FLT3-D835Y	**1**	Rot - 100	**Cys**	99	99	2,3
Ret(h)	4	Rot - 100	Ser	37,8	52,6	13
FLT3 wt	**5**	Rot - 100	**Cys**	100	100	0,4
Lyn(h)	7	Rot - 100	Ala	30,8	44,8	270
MEK2(h)	11	Rot - 75	**Cys**	17,7	30,5	n.v.
Lck(h) activated	15	Rot - 75	Ala	30,8	45,6	230
Axl(h)	17	Rot - 75	Ala	27,3	41,6	9
IRAK1(h)	19	Rot - 75	Gly	17,2	33,4	14
KDR(h)	21	Gelb - 50	**Cys**	47,4	62,8	1,5
MEK1(h)	33	Gelb - 50	**Cys**	17,4	30,5	n.v.
Abl(h)	40	Gelb - 50	Ala	30,5	46,5	150
FGFR1(h)	41	Gelb - 50	Ala	42,4	56,7	520
FGFR2(h)	56	Grün - 50	Ala	41,9	56,7	570
JAK2(h)	56	Grün - 50	Gly	26,2	41	410
NEK2(h)	58	Grün - 50	Gly	17,2	30,7	1400
Fms(h)	64	Grün - 50	Gly	54,7	72,4	2,5
cKit(h)	66	Grün - 50	**Cys**	55,8	72,4	0,4
TYK2(h)	68	Grün - 50	Gly	16,6	30,8	n.v.
PKCµ(h)	74	Grün - 50	**Cys**	n.v.	n.v.	n.v.
PDGFRα(h)	76	Grün - 50	**Cys**	56,1	71,5	0,8
PRAK(h)	78	Grün - 50	**Cys**	n.v.	n.v.	n.v.
ROCK-I(h)	85	Grün - 50	Ala	15,7	31,4	460
PDGFRβ(h)	86	Grün - 50	**Cys**	n.v.	n.v.	0,1
JAK1(h)	87	Grün - 50	Gly	27,6	39,2	49
IGF-1R(h), activated	88	Grün - 50	Gly	28,2	43,9	2600
ROCK-II(h)	100	Grün - 50	Ala	14,2	30,8	n.v.
Mnk2(h)	101	Grün - 50	**Cys**	18	31,7	5700
EGFR(h)	104	Grün - 50	Thr	28,8	43,6	n.v.
ERK2	105	Grün - 50	**Cys**	16,9	32,8	n.v.
ERK1	106	Grün - 50	**Cys**	16,6	30,8	n.v.
JAK3(h)	107	Grün - 50	Ala	25	41	1200
Ron(h)	110	Grün - 50	**Cys**	29,1	42,4	7200
GSK3β(h)	122	Grün - 50	**Cys**	16,6	29,4	n.v.
GSK3α(h)	126	Grün - 50	**Cys**	n.v.	n.v.	n.v.

An dieser Stelle ist der Vergleich zu den Selektivitätsmustern klassischer Typ-II-TKI interessant. Hierbei wurde das in der Arbeitsgruppe aus dem bekannten FLT3-Inhibitor-Fragment **AG1295** entwickelte Chinazolin-Derivat **BSc5150** ausgewählt (Abbildung 52), das vermutlich in der inaktiven, DFG-*out* Konformation der Kinase bindet.[218] Dieses wurde in einer Auswahl von 19 Kinasen auf die inhibitorische Wirkung getestet (1 μM Inhibitor, Eurofins KinaseProfiler, Abbildung 52c, d). Hierbei zeigt sich, dass die Inhibition der Kinasen in der PDGF-Rezeptorfamilie deutlich weniger differenziert ist, während die Selektivität gegenüber wenig verwandten Kinasen gut ist. So ist die Inhibition von cKIT (71%) ähnlich stark wie von FLT3 (77%), zudem werden PDGFRα (36%) und PDGFRβ (28%) inhibiert. Außerdem ist der Typ II-Bindungsmodus sensitiv gegen die Aktivierungsschleifenmutation FLT3(D835Y), die zu einer Bevorzugung der aktiven Kinasekonformation führt und somit Resistenzen gegen Typ II-Inhibitoren aufweist.



c

Kinase	Restaktivität bei 1 µM BSc5150 / %	Anmerkung in KinMap
GSK3beta (h)	114	Grün - 50
Syk (h)	112	Grün - 50
Pim1 kinase (h)	105	Grün - 50
LRRK2 (h)	104	Grün - 50
CK1epsilon (h)	100	Grün - 50
c-Met kinase (h)	99	Grün - 50
ROCK1 (h)	99	Grün - 50
IGF1R kinase (h)	99	Grün - 50
FLT3 D835Y kinase (h)	97	-
KDR kinase (h) (VEGFR2)	95	Grün - 50
Fms/CSFR kinase (h)	90	Gelb - 50
Abl kinase (h)	89	Gelb - 50
Lyn A kinase (h)	84	Gelb - 50
EGFR kinase (h)	82	Gelb - 50
FGFR1 kinase (h)	81	Gelb - 50
MEK1/MAP2K1 (h)	75	Rot - 75
PDGFRbeta kinase (h)	72	Rot - 75
PDGFRalpha kinase (h)	64	Rot - 75
c-kit kinase (h)	29	Rot - 100
FLT-3 kinase (h)	23	Rot - 100

d

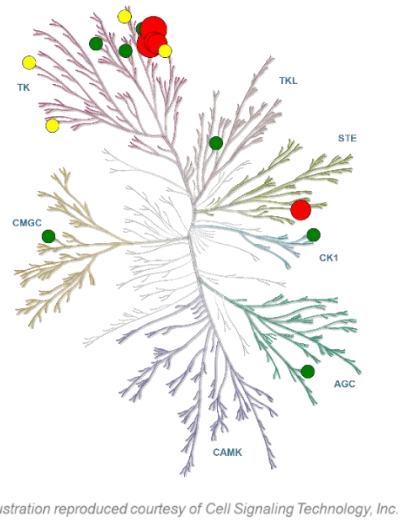


Abbildung 52. (a) Entwicklung des Typ II-Inhibitors **BSc5150**.[218] (b) Oberfläche von **BSc5150** in der inaktiven DFG-*out* Konformation von FLT3 (PDB: 1RJB). Selektivität der Inhibition in einer Auswahl von 18 Kinasen, FLT3wt und FLT3(D835Y) sowie (d) Darstellung der Selektivitäten im Kinase-Dendrogramm mit KinMap.[93]

3.1.12 Zeit- und ATP-abhängige Inhibition von FLT3

Zusätzlich wurde die ATP- und Zeit-abhängige Inhibition der FLT3-Kinase durch die aktivsten Verbindungen der Indolinon-Derivate **BSc5371** und **BSc5318** und der Bisaminopyrimidine **BSc5311** und **BSc5312** sowie der Referenz-Inhibitoren untersucht. Wie erwartet zeigten die reversibel bindenden FLT3-Inhibitoren **Sunitinib** und **Crenolanib** eine starke Abhängigkeit von der ATP-Konzentration, bei der eine 10-fach höhere ATP-Konzentration (100 μM zu 1 mM, Abbildung 53) zu einer 10-fachen Verringerung der Inhibition führte, wobei **Crenolanib** (IC_{50} = 4.2 nM zu 42 nM), wie auch im MV4-11 Zellviabilität-Assay zu beobachten war, eine höhere Aktivität als **Sunitinib** (IC_{50} = 8.2 nM zu 105 nM) zeigte. Da die irreversible Bindungsbildung zu einer nicht-Gleichgewichts-Inhibition führt, ist nur der reversible Enzym-Ligand-Komplex vor der irreversiblen, kovalenten Inaktivierung kompetitiv zur Bindung von ATP. In der Tat ist die Inhibition von FLT3(D835Y) deutlich weniger durch hohe ATP-Konzentrationen beeinträchtigt, wobei **BSc5371** (IC_{50} = 11.6 nM bei niedriger ATP-, 18.6 nM bei hoher ATP-Konzentration), analog dem zellulären Assay, aktiver ist als **BSc5318** (67 nM bei niedriger ATP-, 58 nM bei hoher ATP-Konzentration). Die Bisaminopyrimidin-basierten Inhibitoren sind im Gegensatz dazu deutlich sensitiver gegenüber hohen ATP-Konzentrationen, wobei **BSc5312** (IC_{50} = 45 nM bei niedriger ATP-, 289 nM bei hoher ATP-Konzentration) aktiver ist als **BSc5311** (IC_{50} = 412 nM bei niedriger ATP-, > 1.000 nM bei hoher ATP-Konzentration), das seine inhibitorische Wirkung bei einer hohen ATP-Konzentration nahezu vollständig verliert.

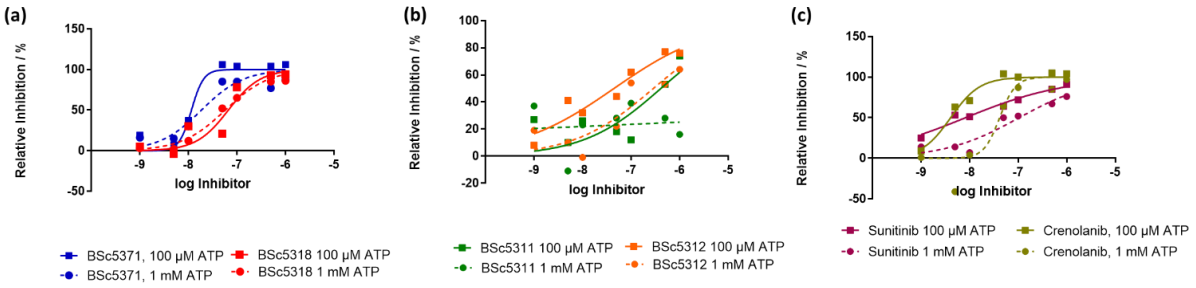
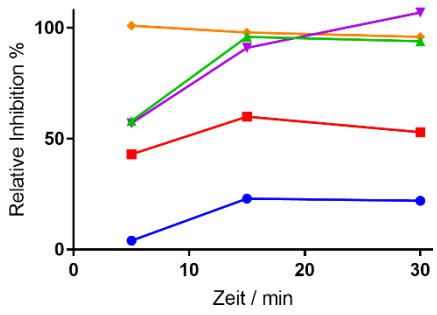


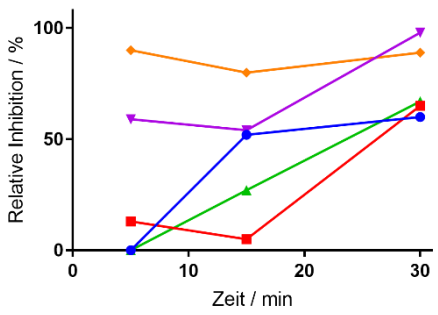
Abbildung 53. Dosis-Wirkungskurven der Inhibition von FLT3(D835Y) durch verschiedene Inhibitoren. (a) Die Inhibition von FLT3(D835Y) durch **BSc5318** und **BSc5371** ist wenig empfindlich gegenüber hohen ATP-Konzentrationen, während sowohl (b) elektrophile Bisaminopyrimidin-basierte als auch (c) reversible FLT3-Inhibitoren deutlich an Wirkung verlieren. (30 min Vorinkubationszeit).

Zusätzlich wurde die Inhibition von FLT3(D835Y) und FLT3(ITD) bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten von Inhibitor und Kinase bestimmt (Tabelle 8). Während ein reversibler Inhibitor ein Gleichgewicht mit dem kompetitiven Substrat bildet und die Inhibition mit unterschiedlichen Vorinkubationszeiten nicht variiert, sollte ein irreversibler Inhibitor mit steigender Inkubationszeit ohne kompetitivem Substrat eine höhere Inhibition zeigen. Somit wird die Zeit verlängert, in der das vorgelagerte, reversible Gleichgewicht vorliegt und die kovalente Inaktivierung ermöglicht wird. Sowohl in FLT3(D835Y) als auch in FLT3(ITD) zeigt sich eine starke Zeitabhängigkeit der Inhibition durch die irreversiblen Inhibitoren, während die Inhibition durch **Crenolanib** konstant blieb. Die Inhibition durch die Indolinon-Derivate ist dabei in FLT3(D835Y) zu allen Zeitpunkten deutlich höher, was ein Hinweis auf die Bindung in der aktiven, DFG-*in* Form von FLT3 darstellt. Die Inhibition von FLT3(ITD) steigt erst mit längerer Inkubationszeit deutlich an, was darauf schließen lässt, dass die Geschwindigkeit der Assoziation des Liganden an die FLT3(ITD) gering ist, und erst mit einer längeren Inkubationszeit eine hohe Besetzung der ATP-Bindungstasche in FLT3(ITD) vorliegt.

Tabelle 8. Einfluss unterschiedlicher Dauer der Vorinkubation von Inhibitor und FLT3 vor ATP- und Substrat-Zugabe.

	Relative Inhibition / % - 100 µM ATP, 50 nM inhibitor					
Verbindung	**FLT3(D835Y)**			**FLT3(ITD)**		
	5 min	**15 min**	**30 min**	**5 min**	**15 min**	**30 min**
BSc5311	4	23	22	0	52	60
BSc5312	43	60	53	13	5	65
BSc5318	58	96	94	0	27	67
BSc5371	57	91	107	59	54	98
Crenolanib	101	98	96	90	80	89





3.1.13 Trypsin-Verdau und MALDI-MS-Analyse der kovalent modifizierten FLT3-Kinase

Die kovalente Modifikation von Cys828 in der ATP-Bindungstasche wurde durch einen Trypsin-Verdau von FLT3wt, nach Reinigung des Proteins mittels Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE), im Gel durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass für die massenspektroskopischen Analyse der überschüssige, ungebundene Inhibitor entfernt wurde und somit nicht die Ionisierung der gesuchten Fragmente verhinderte. In diesem Projekt erfolgte die Messung über MALDI-MS (*matrix assisted laser disorption ionization mass spectrometry*), die eine deutlich sensitivere Analyse der erhaltenen Fragmente erlaubt als die Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS), mit der keine der gesuchten Massen detektiert werden konnte. Die Isolierung der Fragmente des FLT3-Verdaus erfolgte dabei über eine μC18-Festphase. Durch die Protease-Spezifität von Trypsin, die nach basischen Aminosäuren Proteine spaltet (Arg, Lys), wurde das Fragment IC^{828}DFGLAR freigesetzt und konnte mit der entsprechenden Modifikation an Cys828 detektiert werden. Wenn keine Inkubation mit einem irreversiblen Inhibitor durchgeführt wird, führt das Standard-Denaturierungsprotokoll (Kapitel 5.3.15) mit Reduktion der Disulfid-Brücken durch Dithiothreitol (DTT) zum Carboxamid-Addukt des Cysteins, das detektiert werden konnte. Dabei stimmten die gefunden Massen mit den berechneten Massen und die gefundenen mit den kalkulierten Isotopenmuster für **2-Iodacetamid**, **Hypothemycin**, **BSc5371**, **BSc5234** und **BSc5318** überein (Kapitel 5.3.4). Für dasselbe Experiment konnte in **BSc5312** und **BSc5311** jedoch keine entsprechende Masse detektiert werden. Durch nachfolgende MS/MS-Analyse der gefundenen Peptidmassen konnte eine Reihe von typischen Fragmenten zugeordnet werden und somit die kovalente Bindung gezeigt werden.

3.1.14 Bestimmung der Halbwertszeit irreversibler FLT3-Inhibitoren gegenüber verschiedenen Nukleophilen

Die Bestimmung der Halbwertszeiten der elektrophilen Verbindungen wurde mit einem HPLC-basierten Assay mit einem 100-fachen Überschuss an nukleophilem Aminosäure-Derivat durchgeführt (Abbildung 54).

Während das Acrylamid **BSc5233** und das α-Fluoracetamid-Derivat **BSc5315** ($t_{1/2}$ > 24 h) hoch stabil sind, sind das Propargylamid **BSc5238** ($t_{1/2}$ = 50 min) und die Treffer aus dem virtuellen *Screening*, das 2-Chloracetamid-Derivat **BSc5237** ($t_{1/2}$ = 384 min) und das Vinylsulfonamid-Derivat **BSc5234** ($t_{1/2}$ = 71 min) deutlich weniger stabil. Die Halbwertszeit wird durch Einführung der basischen Triethylamin-Gruppe in **BSc5318** ($t_{1/2}$ = 218 min) und **BSc5371** ($t_{1/2}$ = 52 min) zudem verringert. Gleichzeitig ergibt sich auch eine geringere Inhibition von FLT3(D835Y), wenn **BSc5371** mit einem 1000-fachen Überschuss an Glutathion (100 nM Inhibitor) für 30 min (68% Inhibition) oder 24 h (37% Inhibition) inkubiert wurde, während die direkte Inkubation mit der FLT3(D835Y) eine 95% Inhibition der Kinaseaktivität zeigte. Eine Erhöhung des pH-Wertes des Puffers führt zu einer weiteren Verringerung der Halbwertszeit (28 min, pH 8), während eine Erniedrigung des pH-Wertes zu einer erhöhten Halbwertszeit führte (130 min, pH 6.8). Die weiteren nukleophilen Aminosäuren, die in diesem Assay getestet wurden (α-N-Cbz-geschütztes Lysin, Serin und Threonin) zeigten keinen Umsatz mit der Leitstruktur **BSc5371** (pH 7.4).

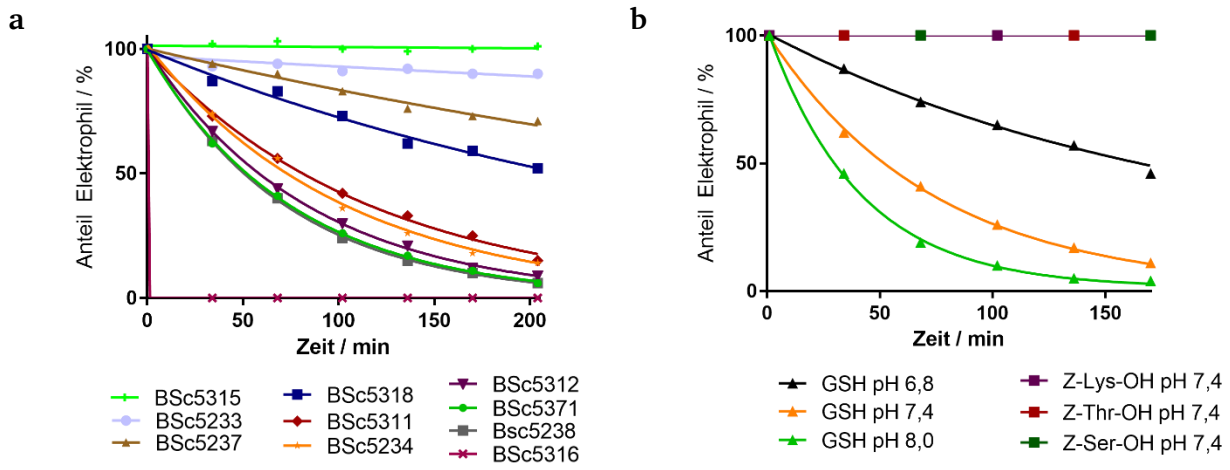


Abbildung 54. (a) Halbwertszeiten elektrophiler Inhibitoren (10 µM) gegenüber Glutathion (100-facher Überschuss, pH 7.4). (b) Halbwertszeit von **BSc5371** gegenüber verschiedener Nukleophile und Aminosäuren.

3.1.15 Inhibition von Therapie-resistenten Mutationen der FLT3-Kinase

Um den Einfluss der hoch aktiven, irreversiblen Leitstruktur **BSc5371** auf Therapie-resistente Mutationen der FLT3 zu evaluieren, wurden die K_d-Werte der Interaktion mit FLT3wt, der FLT3-Mutationen der ersten Generation (FLT3(ITD), FLT3(D835H)), die typischerweise vor Therapie-Beginn der AML diagnostiziert werden können, und Mutationen der zweiten Generation, die typischerweise nach einem Krankheitsrückfall des Patienten diagnostiziert werden, ermittelt. Dazu wurde die Affinität gegenüber den doppelt-mutierten Varianten, FLT3(ITD, D835V) und der FLT3(ITD, F691L)-Mutation bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit der *KinomeScan*-Plattform durch das Unternehmen DiscoverX (San Diego, CA, USA; Kapitel 5.3.1.6.2).
Der Vorteil dieser Plattform ist, neben der seltenen Zugänglichkeit von mutierten Kinasen, dass eine Reihe weiterer experimenteller und klinisch evaluierter Inhibitoren bereits mit dieser Methode getestet wurden, die Ergebnisse in der Literatur beschrieben sind und somit einen guten Vergleich der Affinitäten erlauben (Tabelle 9). **Sunitinib** und **Crenolanib** zeigten eine höhere Affinität für FLT3(ITD) und FLT3wt als **BSc5371**, wobei die Typ I-Inhibitoren **Midostaurin** und das Bisaminopyrimidin **VX-680** eine geringere Affinität zeigten. Interessanterweise zeigte **Sunitinib** eine ~6-fach höhere Affinität für FLT3(ITD) (0.99 nM) als **BSc5371** (5.8 nM), wobei die zytotoxische Aktivität in der FLT3(ITD)-Zelllinie MV4-11 von **BSc5371** ungefähr 10-fach höher ist als für **Sunitinib**, was ein Hinweis auf eine stärkere physiologische Inhibition der Kinase ist. **Crenolanib** und **Sorafenib** zeigten eine deutlich geringere Aktivität in den sowohl ITD als auch Punkt-mutierten Kinaseformen FLT3(ITD, D835V) und FLT3(ITD, F691L), während die Affinität für **BSc5371** im Gegensatz zur einfachen ITD-Mutation erhöht ist. Dabei zeigte sich im Vergleich zu **Crenolanib** (3.3 nM) eine 4-fach höhere Inhibition für die zusätzlich Mutation der Aktivierungsschleife durch **BSc5371** (0.83 nM). Noch drastischer war der Vorteil in der Inhibition der FLT3(ITD, F691L)-Mutation, in der **BSc5371** (1.5 nM) eine 15-fach höhere Affinität gegenüber **Crenolanib** (22 nM) zeigte. Die Bindung des Typ II-Inhibitors **Sorafenib** ist noch stärker durch die doppelte Mutation betroffen, die eine aktive Kinasekonformation bevorzugt. Somit zeigt sich das große Potential, Therapie-resistente Mutationen durch eine irreversible Inhibition zu überwinden.

Tabelle 9. Bindungsaffinitäten (K_d-Werte) von **BSc5371** und ausgewählten Inhibitoren in klinischen Studien an einer Auswahl von FLT3-Varianten. * = nach Zimmerman et al.;[219] # = nach Davis et al.[110]

Inhibitor	FLT3 / K_d / nM				
	D835H	FLT3-ITD	ITD, D835V	ITD, F691L	wt
BSc5371	**1,3**	**5,8**	**0,83**	**1,5**	**2,3**
Sunitinib#	4,3	0,99	*n.a.*	*n.a.*	0,41
Midostaurin#	6,8	11	*n.a.*	*n.a.*	11
Sorafenib*	11	95	630	860	13
Quizartinib#	3,7	8,8	*n.a.*	*n.a.*	1,3
VX-680#	14	45	*n.a.*	*n.a.*	6,5
Crenolanib*	0,16	0,26	3,3	22	0,15

Der Vergleich der Affinität von **BSc5371** zwischen der autoinhibierten (K_d = 65 nM) und der nicht-autoinhibierten Form (K_d = 2.3 nM) zeigt eine 28-fache Verringerung der Affinität, die in einer ähnlichen Größenordnung wie die anderer Typ I-Inhibitoren wie **Midostaurin** und **Sunitinib** liegt, während Typ II-Inhibitoren wie **Sorafenib** und **Quizartinib** typischerweise eine 100- bis 1000-fache Verschiebung in der Affinität zeigen. Somit ist die Inhibition der aktiven Form der Kinase, die mit dem Homologie-Modell der DFG-*in*-Form gezielt versucht wurde zu besetzen, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zutreffend und steht in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen zur Inhibitionsstärke von **BSc5371** in FLT3(D835Y) und der strukturellen und biochemischen Ähnlichkeit zum Inhibitor **9** der Ret-Kinase. Ein endgültiger Beweis kann hingegen erst durch die Aufklärung des Bindungsmodus beispielsweise durch Kokristallografie oder NMR-Spektroskopie des Kinase-Inhibitor-Komplexes mit FLT3 oder einer ebenfalls stark inhibierten Surrogat-Kinase, wie beispielsweise MEK1/2 oder RET getroffen werden.

3.1.16 Zeitabhängige Inhibition der MV4-11 Zellviabilität

Um den zeitabhängigen Verlauf der zytotoxischen Wirkung näher zu untersuchen, wurde die Zellviabilität von MV4-11 Zellen mit dem chemolumineszenten *RealTime*-Glo Assay (Promega) bei verschiedenen Zeitpunkten nach Start der Inkubation mit **Crenolanib** und **BSc5371** kontinuierlich bestimmt (Abbildung 55). Während die zytotoxische Aktivität der Inhibitoren bereits nach 2 h Inkubationszeit detektiert werden konnte, war eine robuste Modellierung der IC_{50}-Werte für beide Inhibitoren erst nach 8 h möglich. Der größte Unterschied in der zytotoxischen Aktivität wurde nach ca. 18 h beobachtet, wobei **BSc5371** 4.4-fach aktiver war als **Crenolanib**. Sowohl die absolute zytotoxische Aktivität (**BSc5371**: IC_{50} = 10 nM) als auch das Verhältnis (~1.5-fach) blieben nach 24 h bis zum Ende des Assays (77 h) konstant. Dabei wurde ein Plateau erreicht, das, ähnlich zum fluorometrischen Auslesen am Endpunkt des Assays, bei ca. 10 nM Inhibitor liegt. Zusätzlich wurde auch der Einfluss einer kurzen Inkubationszeit des Inhibitors auf die Zellviabilität untersucht (Abbildung 55c). Dazu wurden MV4-11-Zellen für 2 h, 8 h, 24 h oder 72 h mit Inhibitor inkubiert, anschließend die Zellen zentrifugiert und das Medium gewechselt. Die Viabilität der Zellen wurde dann 72 h nach dem Start der ursprünglichen Inkubation ausgelesen. Interessanterweise zeigen kurze Inkubationszeiten mit dem irreversiblen Inhibitor **BSc5371** eine etwas stärkere Wirkung für **Crenolanib** nach 2 h und 8 h Inkubationszeit, während nach 24 h und 72 h die Inhibition der Zellviabilität durch **BSc5371** deutlich stärker wird und dem Trend der kontinuierlichen Inkubation folgt. Die Zelle kann vermutlich in dieser Zeit auf eine irreversible Inhibition reagieren, indem entweder mehr FLT3 exprimiert wird oder die kovalent markierte FLT3 durch beispielsweise proteasomalen Abbau entfernt wird. Ein reversibler Inhibitor wie **Crenolanib** hingegen kann durch die reversible Inhibition auch verschiedene Rezeptormoleküle inhibieren, und wird außerdem nicht durch Glutathion desaktiviert und steht somit wieder für eine Inhibition zur Verfügung, wenn auch, bedingt durch den Waschschritt, in einer deutlich geringeren Konzentration. Dies ist zum einen ein Hinweis auf einen möglichen Mechanismus zur partiellen Resistenzbildung und erlaubt die Entwicklung einer Therapierationale für eine synergistische, therapeutische Verwendung von FLT3- und Proteasom-Inhibitoren. Wie in den gezeigten Western-Blot Experimenten ersichtlich, ist

der Start der Inhibition von FLT3(ITD) in MV4-11-Zellen bereits nach 1 h sehr stark, wie durch die bereits im einstelligen nanomolaren Bereich signifikant geringeren Level an pFLT3 als auch pSTAT5 ersichtlich wird. Somit ist eine Reaktion der Zelle auf den Inhibitor wahrscheinlicher als eine zu geringe initiale Inhibition.

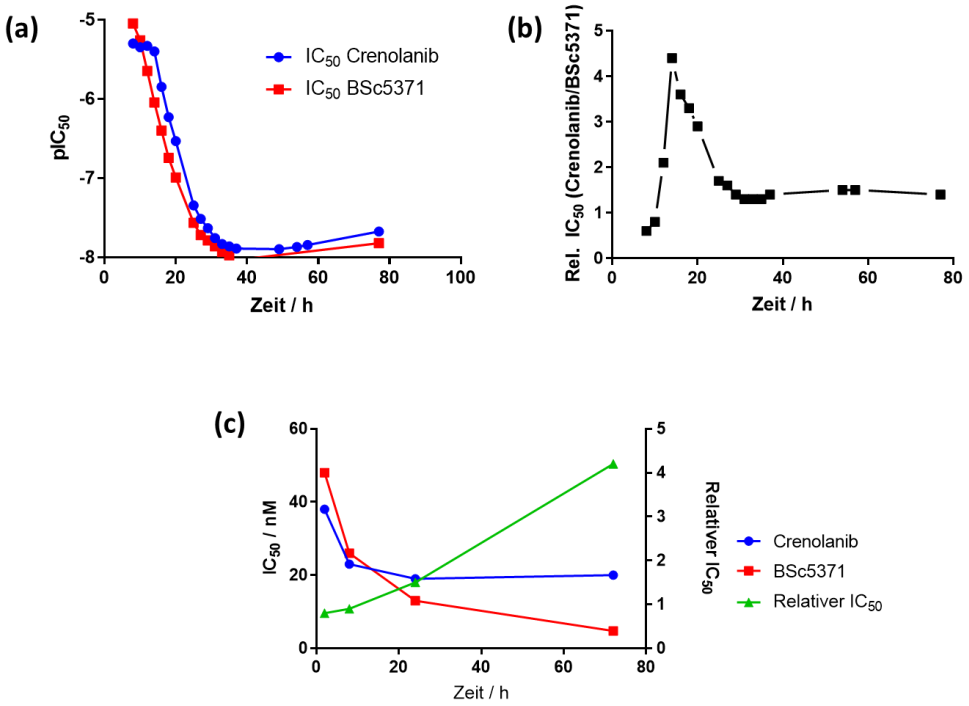


Abbildung 55. (a) Zeitabhängige Inhibition der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Inkubation mit **Crenolanib** und **BSc5371**. (b) Relative Inhibition (IC_{50}(**Crenolanib**)/ IC_{50}(**BSc5371**)) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. (c) Effekt des Auswaschen des Inhibitors nach 2 h, 8 h, 24 h und 72 h Inkubationszeit in MV4-11-Zellen. Die Zellviabilität wird in allen Fällen nach 72 h bestimmt.

3.1.17 Evaluierung irreversibler FLT3-Inhibitoren im *Danio rerio* Toxizitätsassay

Die Biokompatibilität und die toxikologischen Effekte der irreversiblen Inhibitoren in *Danio rerio* Embryonen wurden untersucht, um einen ersten Anhaltspunkt der Toxizität zu erhalten. Diese sind als Modellorganismus in der präklinischen Erforschung von Wirkstoffen etabliert und erlauben eine Einschätzung der Toxizität in Embryonen bis 5 Tage nach Fertilisierung (dpf, Kapitel 5.3.1.8).

Interessanterweise liegt im Zebrafisch kein Cystein-Rest direkt vor dem DFG-Motiv in FLT3, wie im *Homo Sapiens*, sondern ein Alanin. Somit erlaubt dieses Tiermodell nicht die Bestimmung der Kinase-spezifischen Toxizität, sondern die toxikologische Evaluierung der Inhibition von nicht-Ziel Enzymen und die Wirkung von Metaboliten. Der Vergleich der Acetamid-Derivate zeigt, dass die toxische Wirkung des 2-Bromacetamids **BSc5316** und des 2-Fluoracetamids **BSc5315** bei 10 μM Inhibitor deutlich höher ist als die des reversiblen Acetamid-Derivates **BSc5232** und des 2-Chloracetamids **BSc5237**, die bis zum Ende des Assays, 96 h nach Inkubationsbeginn (120 h nach Fertilisation (hpf)) keine toxischen Effekte zeigten (Abbildung 56). Sowohl das Vinylsulfonamid **BSc5234** als auch die Hybridstrukturen **BSc5318** und **BSc5371** sind bei 10 μM zu keinem der untersuchten Zeitpunkte toxisch und damit mit der Wirkung von **Sunitinib**, **Crenolanib** und **Hypothemycin** bei dieser Konzentration vergleichbar (Kapitel 5.3.5). Das Bisaminopyrimidin **BSc5311** zeigte eine erhöhte Toxizität, die vergleichbar mit dem Fragment **BSc5231** ist, somit einen promiskuosen Wirkmechanismus und deshalb eine geringere toxikologische Sicherheit vermuten lässt.

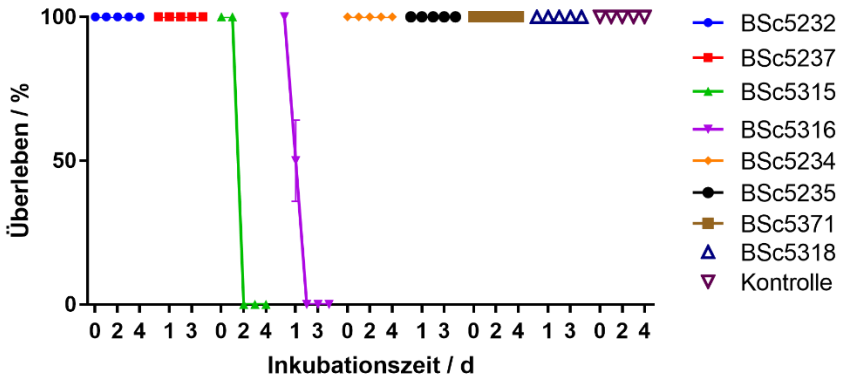


Abbildung 56. Toxizität ausgewählter irreversibler FLT3-Inhibitoren in *Danio rerio* Wildtyp Embryonen (96 hpf, 72 h Inkubationszeit, 10 µM).

3.1.18 Entwicklung irreversibel bindender, fluoreszenter FLT3-Inhibitoren

3.1.18.1 Strukturbasiertes Design

Aus den hoch potenten, irreversibel bindenden FLT3-Inhibitoren **BSc5234** und **BSc5237** sollten in diesem Teil der Dissertation fluoreszente Derivate durch Konjugation der Fragmente mit zwei verschiedenen Bordipyrromethen-Fluorophoren (BODIPY) erzeugt werden (Abbildung 57a). Analog zu der Entwicklung der **Sunitinib**-Hybridstrukturen erlaubt die Substitution an der 3-Position des Pyrrol-Rings die Einführung von Gruppen, die in die Solvens-exponierte Seite der ATP-Bindungstasche ragen. Um einen sterischen Konflikt mit der Kinase zu vermeiden erfolgte die Verknüpfung des Fluorophors mit einer Ethylendiamin-Gruppe, an der die BODIPY-Fluorophore über Acetyl- oder Propionyl-Gruppen verknüpft sind. Bedingt durch die Größe der BODIPY-Gruppe ist hierbei jedoch ein kovalentes *Docking* nicht möglich, da diese zu weit vom Rezeptor entfernt ist und somit keine Interaktionen eingeht. Deshalb wurde ausgehend von der modellierten Struktur von **BSc5371** und **BSc5318** die fluoreszente Gruppe eingeführt und die so erhaltenen Strukturen in ihrer Energie minimiert, um eine beispielhafte Bindungskonformation zu erhalten (Abbildung 57b).

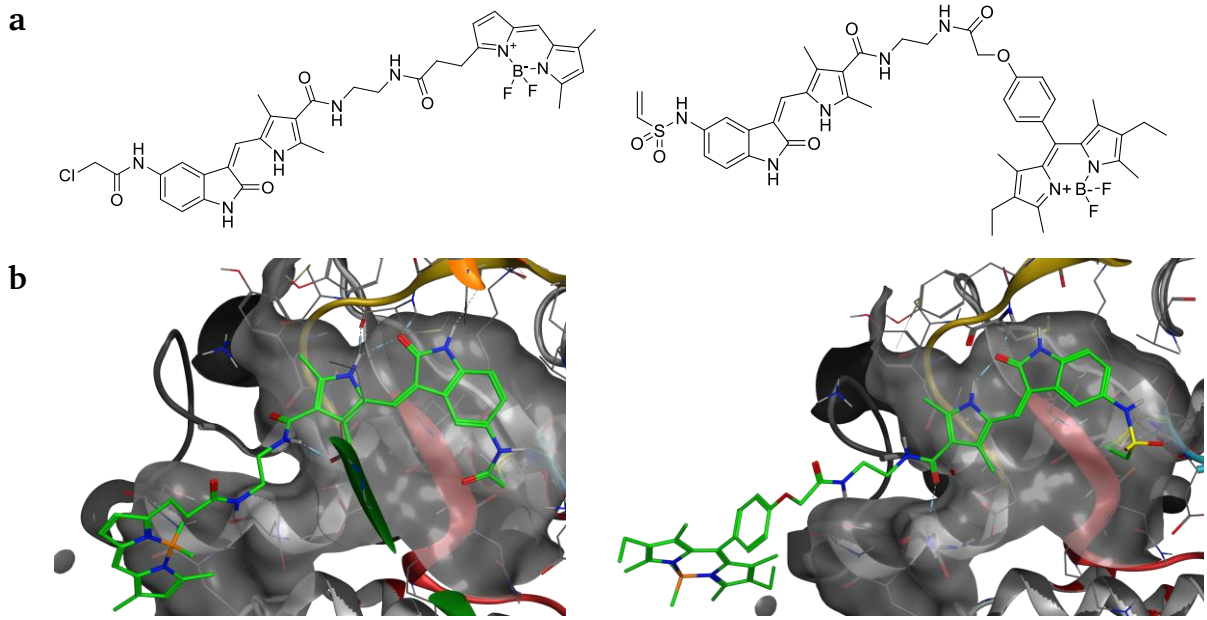
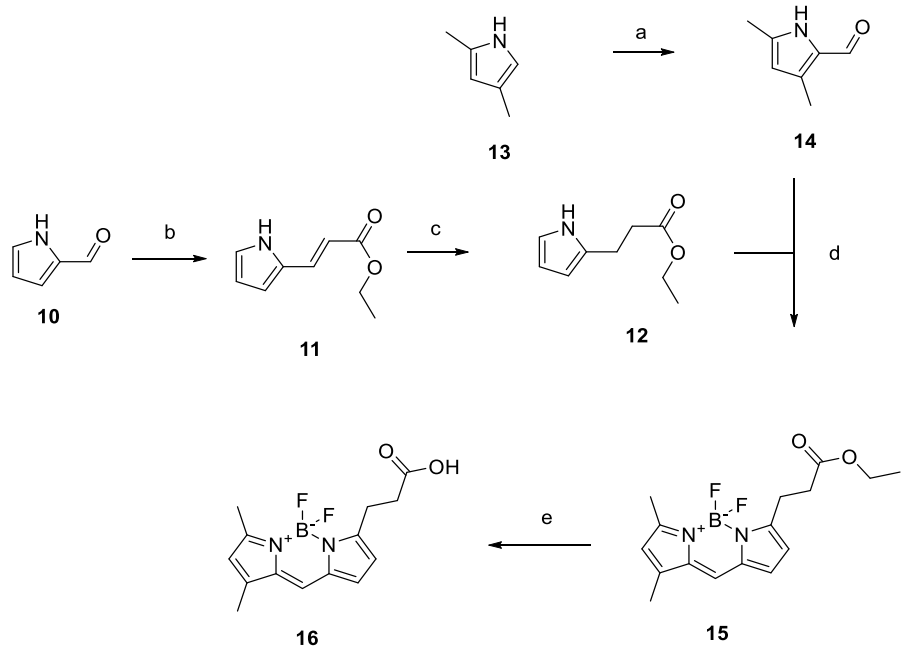


Abbildung 57. (a) Zielstrukturen der BODIPY-konjugierten, irreversiblen FLT3-Inhibitoren. (b) Modellierter Bindungsmodus der Fluorophor-substituierten Inhibitoren.

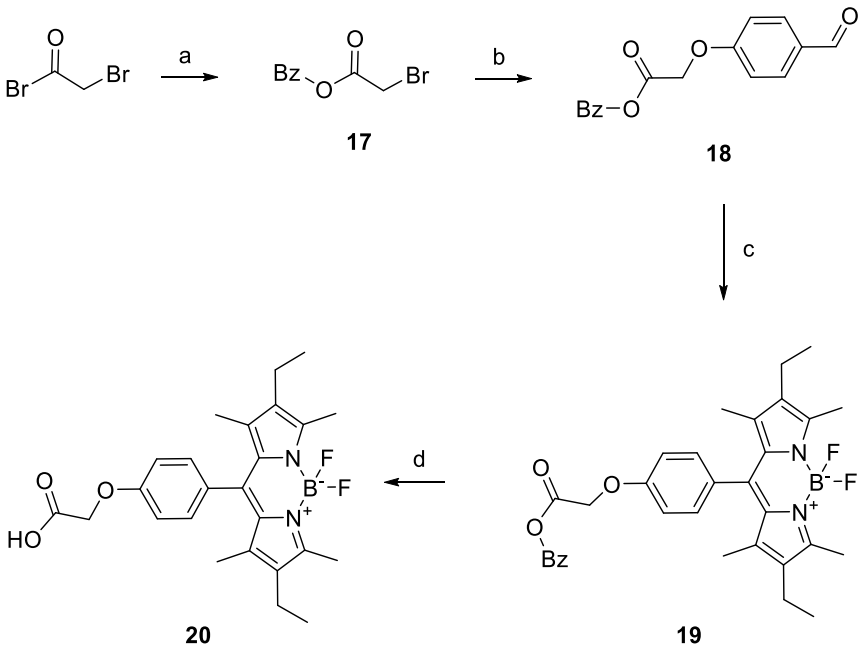
3.1.18.2 Synthese der BODIPY-konjugierten irreversiblen FLT3-Inhibitoren

Die Synthese der BODIPY-Grundgerüste erfolgte in Anlehnung an bereits in der Literatur beschriebene Synthesen. Die Synthese des BODIPY-Fluorophors **15** erfolgt ausgehend von kommerziell verfügbarem Pyrrol-2-carbaldehyd **10**, das in einer Wittig-Reaktion zum 2-substituierten Pyrrolylacrylsäureethylester **11** in 45% Ausbeute umgesetzt wurde (Kapitel 5.2.3.22 ff). Dieser wurde mit Palladium auf Aktivkohle zum Propansäureester **12** reduziert (98% Ausbeute). Die Kondensation zum Dipyrromethen-Ring erfolgt ausgehend von dem Dimethylpyrrolcarbaldehyd **13**, das aus dem Dimethylpyrrol **14** in einer Vilsmeier-Reaktion in 62% Ausbeute hergestellt wurde, und Pyrrol **10** mit Phosphoroxychlorid zum Dipyrromethen-Intermediat, das anschließend in einer Eintopfreaktion unter basischen Bedingungen mit Bortrifluorid-Etherat zum Bordipyrromethen **15** zyklisiert und mit 32% Ausbeute erhalten wurde. Der Ester wurde anschließend verseift und dabei die freie Säure **16** mit 34% Ausbeute erhalten.



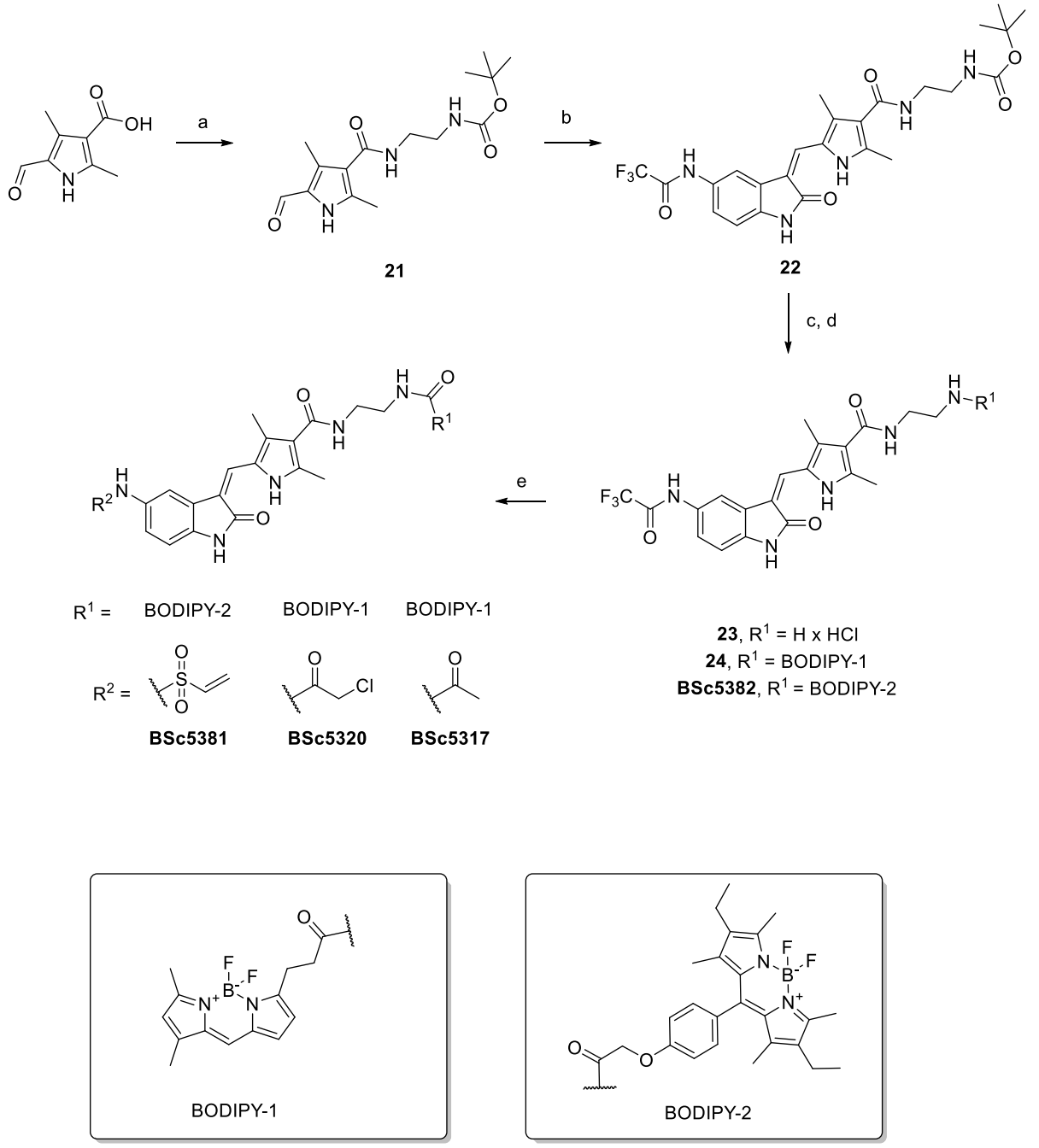
Schema 3. Synthese des Bordipyrromethen-Fluorophors **15**. (a) DMF, Phosphor(V)oxychlorid, 1,2-Dichlorethan, Rückfluss, 30 min; dann Natriumacetat, Wasser Rückfluss, 15 min. (b) Carbethoxymethylentriphenylphosphoran, DCM, Raumtemperatur, über Nacht; (b) H_2, Pd/C, MeOH, Raumtemperatur, 24 h. (c) Phosphor(V)oxychlorid, Raumtemperatur, dann Bortrifluorid-Etherat, *N,N*-Di*iso*propylethylamin, 0°C bis Raumtemperatur, 18 h. (d) Kaliumcarbonat, Wasser, MeOH, Raumtemperatur, 24 h.

Die Synthese des symmetrischen Bordipyrromethen-Grundgerüsts erfolgte ausgehend von einem Benzaldehyd-Derivat. Dieses wird aus 2-Bromacetylbromid hergestellt, das in 81% Ausbeute zum Benzyl-Ester **17** umgesetzt wurde. Dieser wird dann mit 4-Hydroxybenzaldehyd zum Benzaldehyd-Derivat **18** umgesetzt (60% Ausbeute) und anschließend mit Kryptopyrrol unter Säurekatalyse zum Dipyrrol-substituierten Methan-Intermediat umgesetzt. Dieses wurde in einer Eintopf-Reaktion durch Oxidation in das Dipyrromethen-Intermediat überführt und anschließend unter basischen Bedingungen mit Bortrifluorid-Etherat zum BODIPY-Fluorophor **19** umgesetzt (55% Ausbeute). Der Benzyl-Ester wurde durch Hydrierung in die Säure **20** in 85% Ausbeute überführt, die zur Konjugation mit den FLT3-Inhibitoren verwendet werden kann. Der Vorteil dieses BODIPY-Derivats und der Synthesestrategie ist zum einen die effizientere Synthese, als auch die mögliche divergente Einführung von unterschiedlichen Pyrrol-Substituenten, die eine Modulierung der Absorptions-, Emissions- und Exzitationseigenschaften erlauben.



Schema 4. Synthese des *meso*-aryl substituierten Bordipyrromethen **19**. (a) Benzylalkohol, wässrige $NaHCO_3$-Lsg., Acetonitril, 0°C bis Raumtemperatur, 40 min. (b) 4-Hydroxybenzaldehyd, Kaliumcarbonat, Aceton, 60°C, 18 h. (c) Kryptopyrrol, Trifluoressigsäure, Dichlormethan, Raumtemperatur, 18 h; dann 2,3-Dichlor-5,6-dicyanobenzochinon (DDQ), 0°C bis Raumtemperatur, 5 h; dann Bortrifluorid-Etherat, Triethylamin, 0°C bis Raumtemperatur, 18 h. (d) H_2, Pd/C, MeOH, Raumtemperatur, 24 h.

Aufgrund der relativ geringen Stabilität der elektrophilen Kopfgruppen in **BSc5234** und **BSc5237** musste die Synthesestrategie so angepasst werden, dass die Einführung des Elektrophils in der letzten Stufe der Synthese erfolgt. Die doppelt, orthogonal geschützte Indolinon-Gerüststruktur erlaubte die divergente Konjugation des Grundgerüstes mit den verschiedenen Elektrophilen und BODIPY-Fluorophoren. Dieses wurde ausgehend von der bereits dargestellten Pyrrol-3-carbonsäure hergestellt, die mit *N*-Boc-Ethylendiamin unter Standard-Peptidkupplungs-Bedingungen in 70% Ausbeute zum Amid **21** umgesetzt wurde. Dieses wurde mit Trifluoracetyl-geschützten 2-Oxindol **3** in einer Knoevenagel-Reaktion umgesetzt, das bereits zur Synthese der irreversiblen Inhibitoren verwendet wurde, und führt zum Indolinon-Intermediat **22** in 46% Ausbeute. Die Entschützung der Butoxycarbonyl-Schutzgruppe erfolgt unter stark sauren Bedingungen und führte mit 75% Ausbeute zum Hydrochlorid-Salz **23**, wobei die Trifluoracetyl-Schutzgruppe unter diesen Bedingungen stabil ist. Dieses konnte wiederum durch eine Peptidkupplung mit dem BODIPY-Fluorophor **16** zum Intermediat **24** in 58% Ausbeute oder mit dem BODIPY-Fluorophor **20** zum Intermediat **BSc5382** in 64% Ausbeute umgesetzt werden. Die Entschützung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe erfolgte wiederum unter leicht basischen Bedingungen mit Kaliumcarbonat in Wasser und Methanol als Kosolvens, wobei die BODIPY-Gruppen unter diesen Bedingungen, im Gegensatz zu stark sauren oder stark basischen Bedingungen deutlich stabiler ist. Aufgrund der geringen Ansatzgrößen am Ende dieser Syntheseroute wurde das freie Amin nicht isoliert, sondern direkt für den letzten Schritt verwendet. Das nicht-reaktive, Acetamid-substituierte Derivat **BSc5317** wurde dabei durch Reaktion mit Acetylchlorid in 48% Ausbeute erhalten. Das elektrophile, 2-Chloracetamid-Derivat **BSc5320** wurde durch direkte Reaktion des entschützten Amins mit 2-Chloracetylchlorid in 30% Ausbeute erhalten. Das fluoreszente, Vinylsulfonamid-substituierte Indolinon **BSc5381** wurde durch eine analoge Durchführung mittels Reaktion mit 2-Chlorethansulfonylchlorid in 51% Ausbeute erhalten.



Schema 5. Synthese von Bordipyrromethen-substituierten Indolinon-Derivaten **BSc5320**, **BSc5317**, **BSc5381** und **BSc5382**. (a) *N*-Boc-ethylendiamin, *N,N*-Di*iso*propylethylamin, HATU, DMF, Raumtemperatur, über Nacht. (b) **3**, kat. Piperidin, EtOH, Mikrowellenreaktor, 130°C, 90 min. (c) 2 N HCl, MeOH, Raumtemperatur, 72 h. (d) **16** oder **20**, HATU oder HOBt/EDAC HCl, DMF, Triethylamin oder *N,N*-Di*iso*propylethylamin, Raumtemperatur 18 h. (e) Kaliumcarbonat, Wasser, MeOH, Raumtemperatur, 18 h; dann (**BSc5320**) Dichlormethan, Acetylchlorid oder (**BSc5320**) 2-Chloracetylchlorid oder (**BSc5381**) 2-Chlorethansulfonylchlorid, Triethylamin, 0°C bis Raumtemperatur, 18 h.

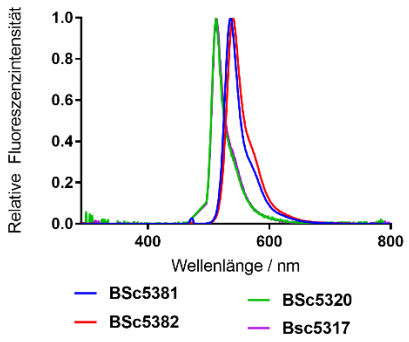
3.1.18.3 Physikochemische und biochemische Evaluierung von BODIPY-konjugierten, irreversiblen FLT3-Inhibitoren

Nach der erfolgreichen Synthese der BODIPY-konjugierten FLT3-Inhibitoren wurde die Inhibition der Kinaseaktivität, sowie die zytotoxische Aktivität in verschiedenen Zelllinien untersucht. Die Inhibition von FLT3(D835Y) durch **BSc5381** (89%) und **BSc5320** (55%) bei 1 μM Inhibitor ist deutlich geringer als die der korrespondierenden, von **Sunitinib**-abgeleiteten Inhibitoren, **BSc5371** und **BSc5318**, aber höher als die der analogen reversiblen Inhibitoren **BSc5382** (34%) und **BSc5317** (23%), was trotz der geringeren Affinität für einen kovalenten Bindungsmechanismus spricht (Abbildung 58a). Die Inhibition von FLT3*wt* ist deutlich geringer als für FLT3(D835Y) bei 1 μM Inhibitor, wobei FLT3(D835Y) bereits bei 100 nM Inhibitor durch **BSc5381** und **BSc5382** nicht mehr inhibiert wird.

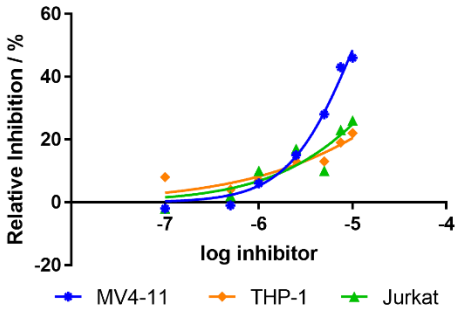
a

	Relative Inhibition / %			
	FLT3wt	FLT3(D835Y)		
Verbindung	1 µM	10 µM	1 µM	100 nM
BSc5320	*n.b.*	101	55	*n.b.*
BSc5317	*n.b.*	*n.b.*	23	*n.b.*
BSc5381	22	92	89	0
BSc5382	13	37	34	0

b



c



d

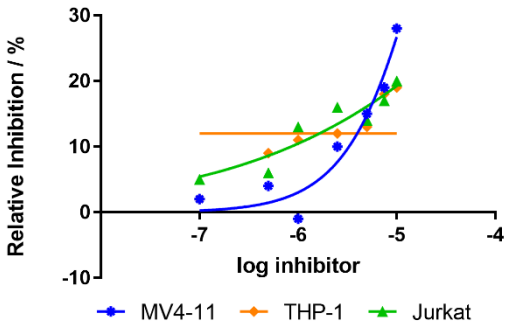


Abbildung 58. (a) Relative Inhibition der Kinaseaktivität durch BODIPY-konjugierte FLT3-Inhibitoren (100 µM ATP, 30 min Vorinkubation). (b) Fluoreszenz-Emissions-Spektren der BODIPY-konjugierten Inhibitoren (Anregungswellenlänge 485 nm). (c) Zytotoxische Aktivität von **BSc5320** und (d) **BSc5381**.

Dies spricht dafür, dass die Inhibition weniger effektiv als durch die Fragmente ist und möglicherweise sterische Konflikte vorliegen. Die Konjugation mit zwei unterschiedlichen BODIPY-Grundgerüsten erlaubt nicht nur die Einschätzung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, sondern auch eine Variation von Absorptions- und Emissionseigenschaften und damit des *Stokes-Shift*. Das Absorptionsmaximum für die Inhibitoren mit dem BODIPY-Grundgerüst **20** liegt bei 520 nm, das Emissionsmaximum bei dieser Anregungswellenlänge bei 536 nm und führt zu einer Stokes-Verschiebung von 16 nm (Kapitel 5.3.3). Diese lagen somit bei höheren Wellenlängen als die des BODIPY-Grundgerüstes **16** (Abs. 500 nm, Em. 510 nm, *Stokes-Shift* = 10 nm). Die Inhibition der Zellviabilität durch die BODIPY-konjugierten Inhibitoren ist ebenfalls deutlich geringer als die der zugrunde liegenden Indolinon-Fragmente **BSc5234** und **BSc5237**, und ist im Gegensatz zu den Leitstrukturen **BSc5318** und **BSc5371** nicht mehr selektiv gegenüber FLT3-abhängigen Zelllinien (Abbildung 58c, d), wenn auch bei MV4-11-Zellen eine leicht höhere Inhibition der Zellviabilität erkennbar war. Somit eignen sich die Inhibitoren **BSc5320** und **BSc5381** nicht für eine mögliche diagnostische Anwendung zum Nachweis der FLT3 Kinase von beispielsweise aus Patienten entnommenen Blutproben bzw. Knochenmark-Aspiraten oder als Werkzeug für zelluläre Analysen, beispielsweise zur kompetitiven Bestimmung der FLT3 Inhibition. Ein Problem hierbei ist einerseits die massive Erhöhung des Molekulargewichts durch Einführung des BODIPY-Fluorophors und der Verknüpfungsgruppen, als auch die damit zusammenhängende, verringerte Zellpermeabilität. Zudem sind die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Optimierung der Leitstruktur durch die starke Veränderung und Dekoration des Grundgerüsts vermutlich massiv verändert.

Die Entwicklung und Diskussion neuer Strategien, die diese Probleme in zukünftigen Arbeiten überwinden sollen, erfolgt anhand einer kovalenten *Docking*-Studie in Kapitel 5.3 und im Ausblick dieser Dissertation (Kapitel 4).

Um die kovalente Bindung der Inhibitoren an isolierter Kinase zu visualisieren und nachzuweisen wurde die isolierte FLT3(D835Y)-mutierte Kinase mit den fluoreszent-markierten, irreversibel bindenden Inhibitoren **BSc5381** und **BSc5320** und mit den reversibel bindenden, analogen Inhibitoren **BSc5382** und **BSc5317** inkubiert. Die Proben wurden anschließen denaturiert und das markierte Protein durch Gelelektrophorese von dem überschüssigen Inhibitor getrennt. Die Proteine wurden

dann mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert, um eine fluoreszente Detektion zu ermöglichen. Das Auslesen der Blots erfolgt durch Anregung bei 488 nm (Kapitel 5.3.1.10). Dabei konnte eine kovalente Markierung von FLT3(D835Y) durch das Erscheinen einer Bande bei 73 kDa, was der Molekülmasse des Kinase-Konstrukts entspricht, durch **BSc5381** und **BSc5320** detektiert werden, wobei diese für **BSc5381** deutlich ausgeprägter war (~5-fach stärker). Die kovalente Markierung konnte durch Vorinkubation mit 10 mM 2-Iodacetamid und damit einer kompetitive Alkylierung fast vollständig unterbunden werden (8% Fluoreszenz). Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt durch die Software ImageJ. Inkubation mit dem unreaktiven, Acetamid-substituierten Derivat **BSc5317** zeigte keine Fluoreszenz. Interessanterweise zeigte das Trifluoracetamid-Derivat **BSc5382** ein leichtes Fluoreszenzsignal (100 μM: 18% von **BSc5381**; 50 μM: 7% von **BSc5381**).

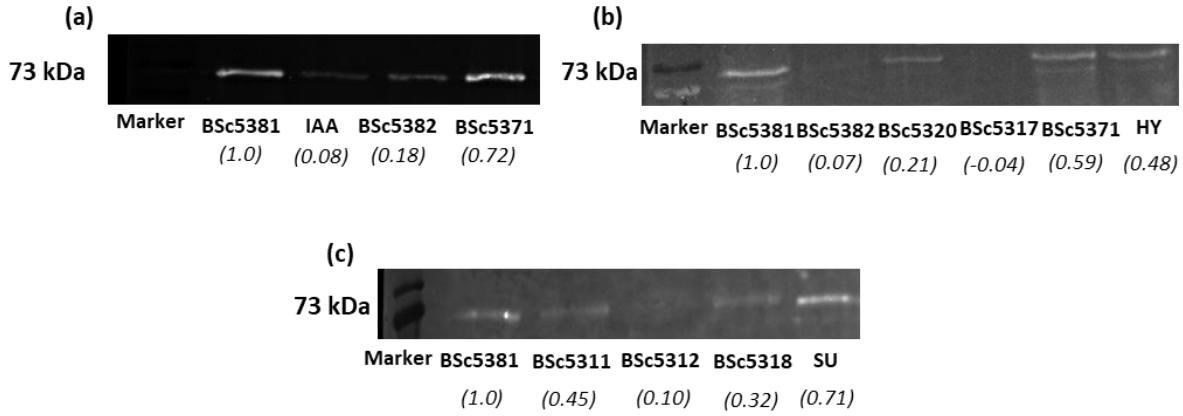


Abbildung 59. Western-Blot von FLT3(D835Y) nach Inkubation mit Inhibitor und Fluorophor und SDS-PAGE. (a) Inkubation mit **BSc5381** oder **BSc5382** (100 µM) und kompetitive Alkylierung durch 2-Iodacetamid (IAA, 10 mM) und **BSc5371** (100 µM) gefolgt von Inkubation mit **BSc5381** (100 µM). (b) Inkubation mit **BSc5381**, **BSc5382**, **BSc5320** oder **BSc5317** (50 µM) und kompetitive Inhibition mit 100 µM **BSc5371** und **Hypothemycin** (HY) gefolgt von Inkubation mit **BSc5381**. (c) Bindung von **BSc5381** (10 µM) und Vorinkubation mit **BSc5311**, **BSc5312**, **BSc5318** und **Sunitinib** (SU, je 100 µM) gefolgt von Inkubation mit **BSc5381** (10 µM).

Um eine kompetitive Wirkung mit anderen, sowohl reversibel als auch irreversibel bindenden Inhibitoren festzustellen, wurden diese zuerst ohne Fluorophor mit FLT3(D835Y) inkubiert und anschließend **BSc5381** in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Dabei zeigt sich eine kompetitive Bindung mit **BSc5371**, wobei die Fluoreszenz durch 100 μM **BSc5371** und 100 μM **BSc5381** (-28%) geringer wird und durch Inkubation mit 50 μM Fluorophor weiter sinkt (-41%) und vergleichbar mit

Hypothemycin (50 μM, -52%) ist. Eine ähnliche kompetitive Wirkung wurde durch Vorinkubation mit den FLT3-Inhibitoren **BSc5311** (-55%) und **BSc5312** (-90%) beobachtet, ebenso mit dem Indolinon **BSc5318** (-68%). Die Inkubation mit dem reversiblen Inhibitor **Sunitinib** zeigte eine leicht verringerte Fluoreszenz (-29%), die ein Hinweis für einen kompetitiven Bindungsmodus darstellt, da die deutlich höhere Inhibition von FLT3(D835Y) zu einer starken Konkurrenz um die Bindungsstelle führt, zumal der Inhibitor in diesem Experiment in einem 10-fach bis 100-fach höheren Überschuss vorliegt. Hier könnte aber die recht hohe Reaktivität der Vinylsulfonamid-Gruppe problematisch sein, die durch Denaturierung des Proteins und der Reduktion der Disulfid-Brücken zu einer Markierung dieser führt. Um die kovalente Markierung der freiwerdenden Cysteine zu verhindern, und nur die Maskierung der im nativen Protein freien Cysteine zu erlauben, kann eine Modifikation dieses Protokolls eingeführt werden. Dazu sollte zuerst das native Protein mit dem zu untersuchenden Inhibitor inkubiert und anschließend die fluoreszente Sonde zugegeben werden. Anschließend können alle nicht-gebundenen Cysteine durch 10 mM 2-Iodacetamid maskiert werden, ebenso wie die durch Reduktion während des Alkylierungsprotokoll freiwerdenden Cysteine, wobei eine selektivere Markierung erreicht werden könnte.

Die Inkubation von Zebrafisch-Embryonen mit den BODIPY-markierten FLT3-Inhibitoren **BSc5320** und **BSc5381** erfolgte mit 10 μM Inhibitor bis 96 hpf (72 h Inkubationszeit) und zeigte eine verstärkte Fluoreszenz und damit die Aufnahme in den Embryo. Durch die Detektion mit dem multispektralen *Nuance Fx* Detektor, der eine Unterscheidung von Fluoreszenzspektren einer biologischen Probe erlaubt, konnte die Aufnahme weiter verfeinert werden (Abbildung 60 bis 61). Dabei wurde ein ähnliches Spektrum detektiert, wie das in Lösung gemessene. Ein Vorteil dieser Methode ist zum einen die Detektion von unterschiedlichen Spektren in verschiedenen Bereichen der Probe und die Möglichkeit, die Hintergrund-Fluoreszenz und Signale, die nicht vom Fluorophor stammen, vom gesuchten Signal zu subtrahieren. Dadurch wird eine spezifische Detektion eines bestimmten Fluorophors ermöglicht. Nach Inkubation mit **BSc5381** und einer Anregungswellenlänge von 488 nm und *Longpass*-Emissionsfilter ab 510 nm, lässt sich ein erhöhtes Fluoreszenzsignal in der Schwanzvene (Signal 1, 2) detektieren, jedoch nicht im Gastrointestinaltrakt. Dies lässt entweder auf eine erhöhte Aufnahme des Inhibitors über die Kiemen oder eine schnellere Ausscheidung schließen. Durch die spektrale Auflösung und Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz kann im

zusammengesetzten Bild der einzelnen Fluoreszenzsignale eine Aufnahme in den Dottersack beobachtet werden (Signal 3). Diese Methode erlaubt außerdem die Quantifizierung, und zeigt anschaulich, dass alle beobachteten Signale durch ein ähnliches Spektrum zustande kommen (Abbildung 60, rechts), die das gleiche Emissionsmaximum bei ca. 540 nm zeigen.

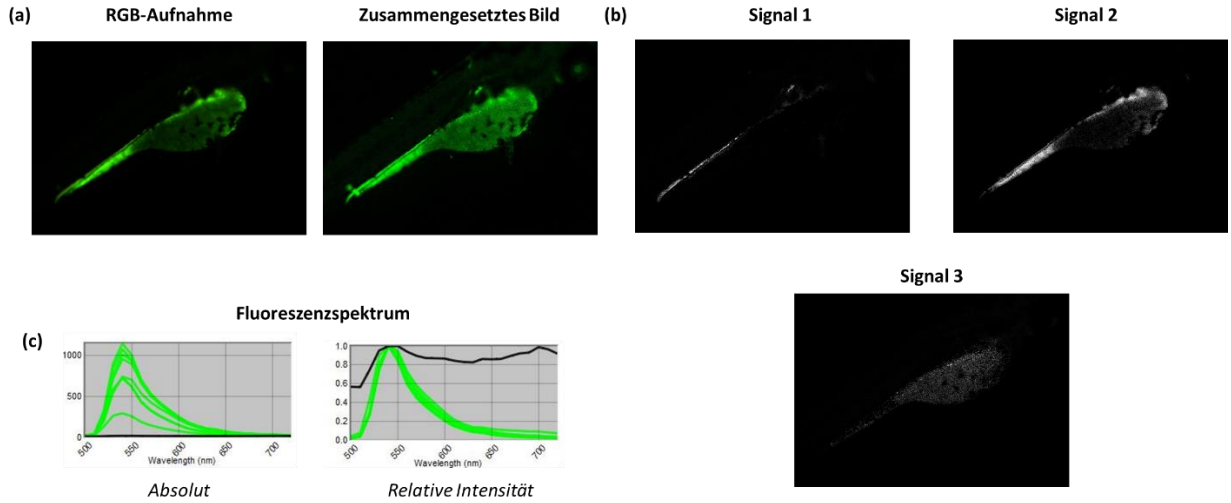


Abbildung 60. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Danio Rerio* Wildtyp Embryonen nach Behandlung mit **BSc5381** und Anregung mit 488 nm. (a) RGB-Aufnahme (links) und neu zusammengesetztes Bild nach multispektraler Analyse (rechts). (b) Isolierte Abbildung der Fluoreszenzsignale 1 bis 3. (c) Absolute und normierte Spektren der Signale 1 bis 3 (grün) und der Hintergrundfluoreszenz (schwarz).

Die Beobachtung der Fluoreszenz desselben Embryos mit einer Anregung von 360 nm ergab im RGB-Bild interessanterweise eine blaue Fluoreszenz des Dottersacks (Abbildung 61a). Das blaue Signal kann nach spektraler Auflösung von dem Signal von **BSc5381** subtrahiert werden, das ein ähnliches Spektrum zeigt wie nach Anregung mit 488 nm und die Verteilung von **BSc5381** sichtbar macht (Abbildung 61b). Das unbekannte Fluoreszenzsignal zeigte ein Emissionsmaximum bei ca. 460 – 470 nm, wobei das Signal von **BSc5381** ungefähr eine doppelt so hohe Intensität zeigt (Abbildung 61c). Die Inkubation eines *Danio Rerio* Embryos mit **BSc5320** zeigt ähnliche Ergebnisse. Hierbei konnte wieder ein, dem Spektrum der Reinsubstanz ähnelndes, Spektrum detektiert und die Verteilung im Embryo analysiert werden (Abbildung 62a). Das Maximum der Fluoreszenz liegt hier bei 510 – 520 nm. Im Gegensatz zu **BSc5381** ließ sich aber auch eine gastrointestinale Aufnahme (Signal 1), zusätzlich zur Aufnahme in der Schwanzvene (Signal 2, 3), beobachten, was auf eine zusätzliche orale

Aufnahme schließen lässt. Beide Farbstoffe zeigten keine toxischen Effekte. Eine mögliche Anwendung dieser Fluorophore sollte in weiteren Arbeiten anhand von Zebrafisch-Larven *Xenograft*-Modellen getestet werden. Hierbei können beispielsweise Fluorophor-markierte, FLT3-mutierte Zellen in die Larve injiziert werden und deren Verteilung im Zebrafisch untersucht werden. Dies kann, ähnlich zu bereits vereinzelt in der Literatur beschriebenen Ansätzen, im Dottersack oder in der Schwanzvene erfolgen. In einem weiteren Schritt kann entweder eine intrinsisch fluoreszente Leitstruktur in diesem präklinischen Modell untersucht werden oder ein nicht-fluoreszenter Inhibitor wird kompetitiv mit einer fluoreszenten Sonde untersucht. Eine weitere mögliche Anwendung stellt ein Zebrafisch *Xenograft*-Modell mit von Patienten erhaltenen Leukämiezellen dar. Diese können im Zebrafisch Embryo auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen, entweder zugelassenen oder in klinischer Entwicklung befindlichen, Wirkstoffen getestet werden und somit eine Vorauswahl einer Therapie getroffen werden. Eine intrinsisch fluoreszente, durch kovalente Modellierung erdachte Leitstruktur, die solche Eigenschaften besitzen könnte, ist in Kapitel 5.3 dargestellt.

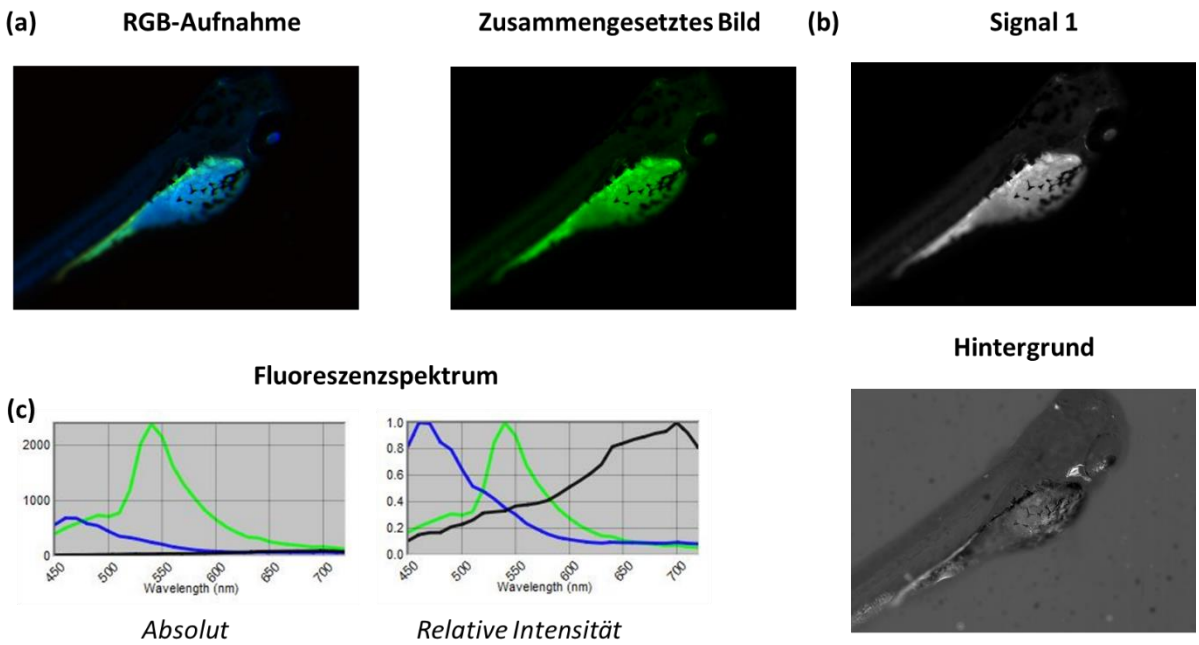


Abbildung 61. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Danio rerio* Wildtyp Embryonen nach Behandlung mit **BSc5381** und Anregung mit 360 nm. (a) RGB-Aufnahme (links) und neu zusammengesetztes Bild nach multispektraler Analyse (rechts). (b) Isolierte Abbildung des Fluoreszenzsignals 1 und Signal des Hintergrundspektrums. (c) Absolute und normierte Spektren des Signals 1 (grün) und der Hintergrundfluoreszenz (schwarz).

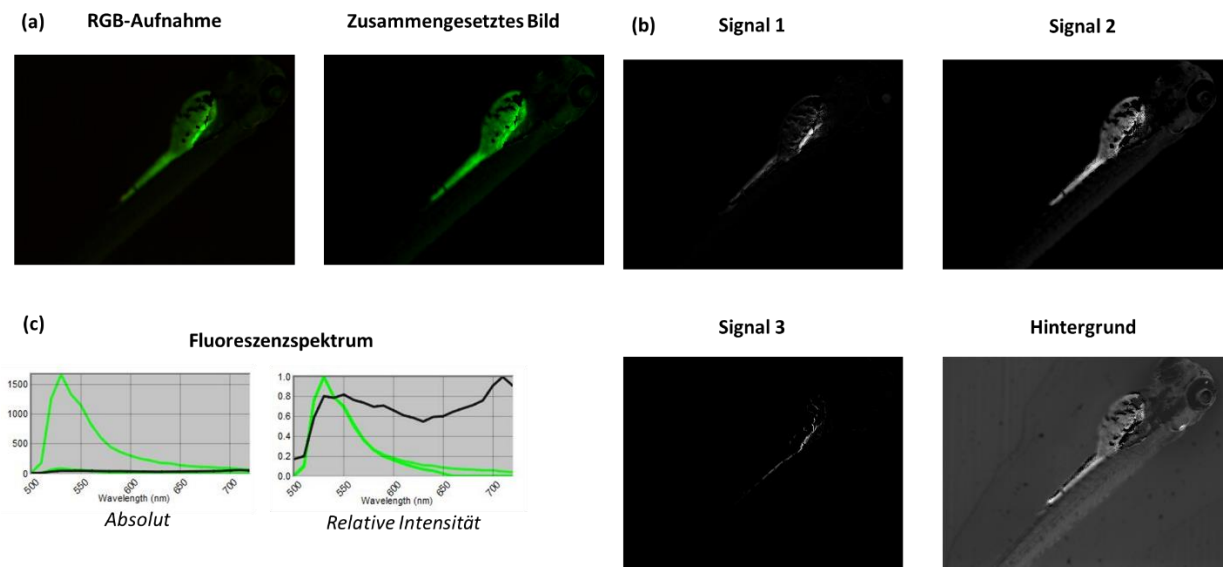


Abbildung 62. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *Danio rerio* Wildtyp Embryonen nach Behandlung mit **BSc5320** und Anregung mit 488 nm (a) RGB-Aufnahme (links) und neu zusammengesetztes Bild nach multispektraler Analyse (rechts). (b) Isolierte Abbildungen der Fluoreszenzsignale 1 bis 3 und das als Hintergrund definierte Spektrum. (c) Absolute und normierte Spektren der Signale 1 bis 3 (grün) und der Hintergrundfluoreszenz (schwarz).

3.2 Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Charakterisierung von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren

3.2.1 Molekulare Modellierung des Einflusses von Met45 auf die Spezifität in der S1-Bindetasche

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte zunächst ein molekularer Erkennungsmechanismus der P1-Tasche des Proteasoms untersucht werden. Hierzu wurden bereits im Rahmen der Dissertationen von Constantin Voss[220] und Christoph Scholz[221] in der Arbeitsgruppe Schmidt verschiedene Proteasom-Inhibitoren auf Basis von **BSc2118** und dazu analoge Substrate synthetisiert (Abbildung 63). Hierbei zeigte sich, dass die Inhibitionsstärke mit der Größe des Restes in P1 steigt, während die Hydrolyse-Geschwindigkeit des analogen Substrats den umgekehrten Trend zeigt, also die katalytische Effizienz mit kleineren Resten in P1, am stärksten durch Alanin, steigt. Während **BSc2118** (P1 = Leu) die stärkste Inhibition von β5c aufweist (IC_{50} = 31 nM) ist diese durch **BSc4945** (P1 = Ala) am niedrigsten (IC_{50} = 987 nM). Die katalytische Effizienz hingegen ist in dem zu **BSc4945**-analogen Substrat **BSc5098** (k_{cat}/K_M = 1.1 $l \cdot \mu mol^{-1} \cdot s^{-1}$) deutlich stärker als in dem bisher verwendeten Substrat Suc-LLVY-AMC (k_{cat}/K_M = 0.5 $l \cdot \mu mol^{-1} \cdot s^{-1}$).

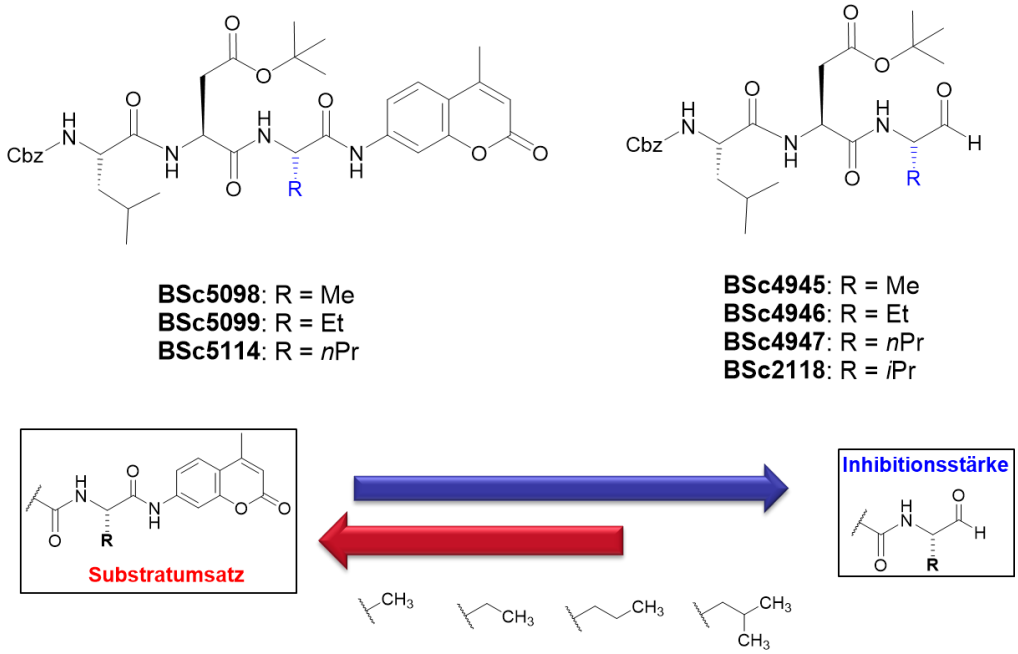


Abbildung 63. Die tripeptidische Leitstruktur **BSc2118** und dessen Derivate mit schrittweise verlängerten P1 Resten (**BSc4945** – **BSc4947**) zeigen eine stärkere Inhibition von β5c für große Reste, während die Effizienz der katalytischen Umsetzung der analogen Substrate durch β5c den gegenläufigen Trend zeigt.

Zudem zeigt sich nach selektiver Inhibition der β5c-Untereinheit durch **Epoxomicin** eine geringe Hydrolyse von Suc-LLVY-AMC (12% der Positivkontrolle), während die Hydrolyse von **BSc5098** nahezu vollständig abgebrochen ist (0.4% der Positivkontrolle). Dies lässt darauf schließen, dass entweder die katalytischen β2c- oder die β1c-Untereinheit ebenfalls zur Hydrolyse nicht optimierter Substrate beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieser Mechanismus weiter untersucht und Erklärungsversuche gegeben werden. Eine Erklärung für den möglichen Regulierungsmechanismus in der S1-Tasche erfolgte durch molekulare Modellierung. Hierzu wurden verschiedene Strukturen des Proteasoms von der *Protein Data Bank* mit MOE in ihrer Konformation untersucht. Wie in Abbildung 30 ersichtlich wird, ist die Konformation des katalytisch aktiven Thr1 zwischen den verschiedenen Strukturen konserviert und ist unabhängig von der Bindung eines Inhibitors. Im Komplex von **BSc2118** und dem Hefeproteasom (yCP) zeigt Met45 einen dihedralen Winkel von -167°, während dieser im nativen Protein bei +48° liegt. Diese Änderung ist auch mit anderen mit sterisch anspruchsvollen P1-Resten zu beobachten. Dazu gehören **BSc4999** (α = -179°), das Naturprodukt **Syringolin A** (α = -175°) und **Bortezomib** (α = -174°). Eine von Groll et al. beschriebene Indolophakelin-Struktur hingegen, das die S1 Tasche nicht besetzt, sondern zwischen der β5 und β6-Tasche bindet, zeigt eine Met45-Konformation, die ähnlich zu der nativen Form ist (α = +51°).[222]

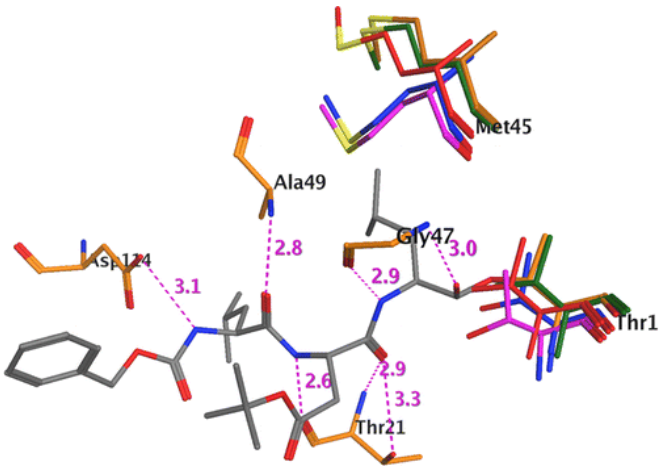
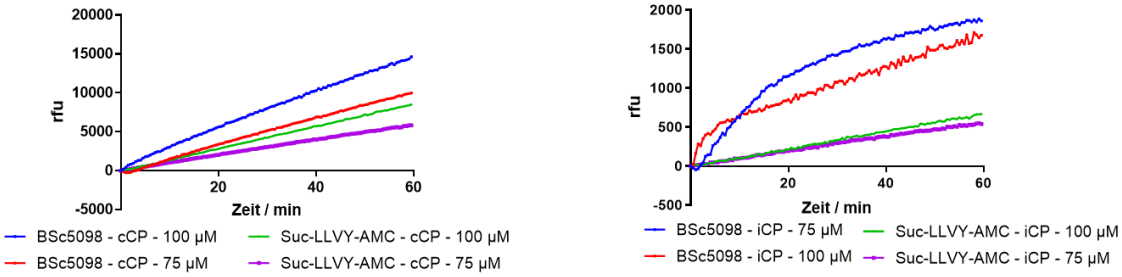


Abbildung 64. Vergleich der nativen (blau, α = +48°) und der mit **BSc2118**-gebundenen (grau, α = -167°) Struktur des yCP. Nachdruck nach Bensinger et al. mit Genehmigung durch das Copyright Clearance Center, 2016, American Chemical Society.[223]

Somit scheint die native Form von Met45 für die katalytische Aktivität vorteilhafter, während eine vergrößerte S1-Tasche große P1-Reste des Inhibitors toleriert und durch hydrophobe Interaktionen die Bindungsaffinität erhöht. Dies erscheint auch logisch, da ein Substrat nur eine moderate Affinität zum Rezeptor aufweisen sollte, da die Dissoziation des Substrats das katalytische Zentrum des Enzyms wieder für nachfolgende Katalyse-Zyklus freilegen muss. Dies ist in ähnlicher Form bei Kinasen zu beobachten, wo ATP nur eine geringe Affinität im typischerweise μM bis mM-Bereich aufweist. Im nächsten Teil dieser Arbeit sollten diese Ergebnisse dann auf ihre Verwendung mit kommerziell verfügbarem cCP und iCP auf die Hydrolyse-Aktivität sowie in Leukämiezellen zur Charakterisierung neuer, in der Arbeitsgruppe entwickelten Proteasom-Inhibitoren angewendet werden. **BSc5098** zeigt eine deutlich höhere Aktivität im cCP (246 rfu/min) als Suc-LLVY-AMC (246 rfu/min, Abbildung 31). Der Umsatz sinkt deutlich durch eine leichte Verringerung der Substratkonzentration auf 75 μM. Im iCP ist der Substrat-Umsatz hingegen deutlich geringer und die Hydrolyse-Geschwindigkeit ändert sich nur wenig mit der Konzentration des Substrats (9 rfu/min bis 32 rfu/min). Eine Erklärung kann durch die kleinere S3-Tasche des iCP erfolgen. Sowohl **BSc5098** als auch Suc-LLVY-AMC haben in P3 ein Leucin-Rest vorliegen, während selektive Inhibitoren von β5i, wie beispielsweise **ONX0914**, hier einen Alanin-Rest aufweisen. Damit könnte die Affinität für das β5i verringert sein, und somit liegt vermutlich eine Sättigung des aktiven Zentrums von β5i vor. Der höhere Umsatz von **BSc5098** im Vergleich zu Suc-LLVY-AMC kann wiederum aus dem kleineren P1-Rest und somit der schnelleren Dissoziation des umgesetzten Substrats von der aktiven Tasche resultieren.



		Umsatz / rfu/min	
Konzentration / µM	Substrat	iCP	cCP
100	BSc5098	28	246
75		31	168
100	SucLLVYAMC	11	143
75		9	98

Abbildung 65. Vergleich der Substratumsetzung von **BSc5098** und Suc-LLVY-AMC im humanen iCP und cCP.

3.2.2 Entwicklung eines zellbasierten Assays zur Proteasom-Inhibition

Das in Kapitel 3.2.1 entwickelte selektive Substratpeptid **BSc5098** soll in dieser Arbeit verwendet werden, um die Inhibition des Proteasoms in den Leukämiezelllinien zu bestimmen. Dazu wurde zuerst die zelluläre Umsetzung des Peptids **BSc5098** mit dem etablierten Suc-LLVY-AMC Substrat-Peptid verglichen. Dazu werden die Zellen analog zu den Experimenten zur Bestimmung der Zellviabilität vorbereitet, wobei vor der Beobachtung des Substratumsatzes die Zellen für 30 min mit dem Substrat äquilibriert werden, damit ein Gleichgewicht des Proteasom-Umsatzes und der Substratverteilung vorliegt (Kapitel 5.3.1.12). In MV4-11 Zellen wurde die höchste Substrat-Umsetzung mit 100 μM **BSc5098** und 50.000 Zellen pro Well beobachtet (135 rfu/min; Abbildung 66), was ca. 4-mal schneller als mit Suc-LLVY-AMC (33.3 rfu/min). Die Unterschiede in der Substratumsetzung steigen dabei mit der Verringerung der Zellzahl (10.000 Zellen / 100 μM: 10-facher Umsatz für **BSc5098**) und Erniedrigung der Substratkonzentration (50.000 Zellen / 25 μM: 13-facher Umsatz für **BSc5098**) und wird besonders stark bei Verwendung niedriger Substrat-Konzentrationen und Zellzahlen (10.000 Zellen / 25 μM: 15-facher Umsatz).

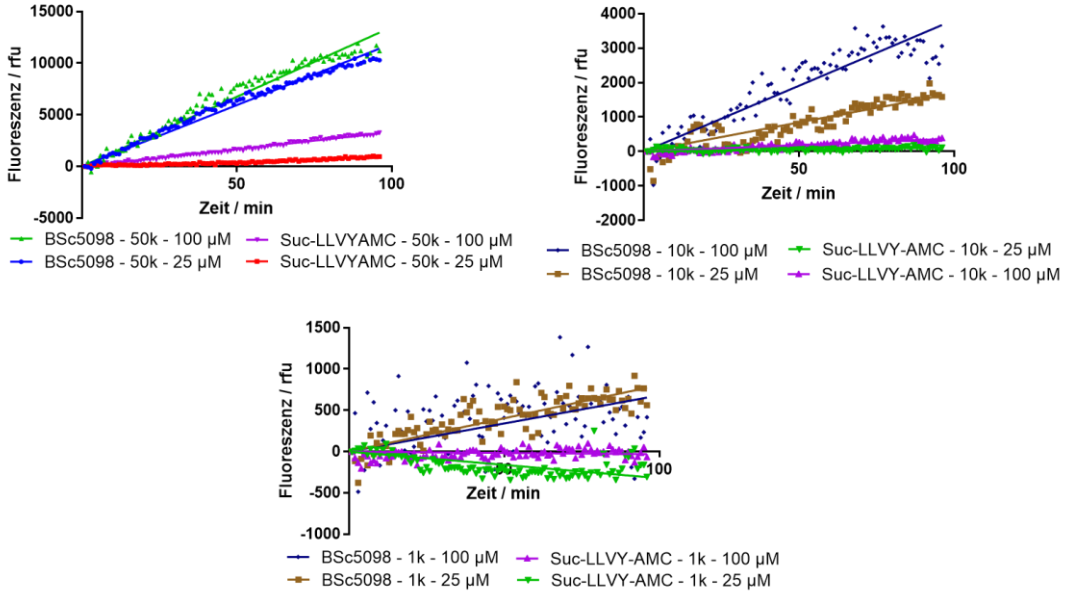


Abbildung 66. Umsetzung der künstlichen Substrate **BSc5098** und Suc-LLVY-AMC in MV4-11 Zellen bei einer Substratkonzentration von 100 µM oder 25 µM und 50.000 Zellen (50k), 10.000 Zellen (10k) oder 1.000 Zellen (1k)

pro *Well*. Die Datenpunkte sind Mittelwerte der technischen Dreifachbestimmung. Die Steigung der Fluoreszenz wurde durch lineare Regression bestimmt.

Bei Verwendung von 10.000 Zellen und 1.000 Zellen pro *Well* zeigte sich zudem eine starke Streuung der Messwerte. Ein Maß für die Qualität eines biochemischen Assays ist der sogenannte Z‘-Faktor. Dieser berechnet sich nach Zhang et al. aus den Standardabweichungen (σ) und Mittelwerten (μ) der Signale der Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK) mit folgender Gleichung:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{PK} + 3\sigma_{NK})}{|\mu_{PK} - \mu_{NK}|}$$

Der Z‘-Wert liegt in einem idealen Assay bei 1, bei einem Z‘-Wert zwischen 0.5 und 1 geht man von einem exzellenten Assay aus, das ein robustes *Screening* veränderter biochemischer Parameter erlaubt. In den Experimenten zur Etablierung des Assays (Abbildung 66) ergaben sich gute Z‘-Werte nur für 50.000 Zellen pro *Well*, wobei bei **BSc5098** sowohl bei einer Konzentration von 100 μM (Z‘ = 0.79) als auch bei 25 μM (Z‘ = 0.72) gute Z‘-Werte zeigten, während Suc-LLVY-AMC nur bei einer Konzentration von 100 μM (Z‘ = 0.76) gute Z‘-Werte lieferte. Eine Übersicht der erhaltenen Mittelwerte, Standardabweichungen und Z‘-Werte der Assay-Etablierung sind in Kapitel 5.3.6 gegeben. Als nächster Schritt sollte der Substratumsatz verschiedener Zelllinien bei konstanter Zellzahl (50.000 Zellen pro *Well*) untersucht werden (Abbildung 67).

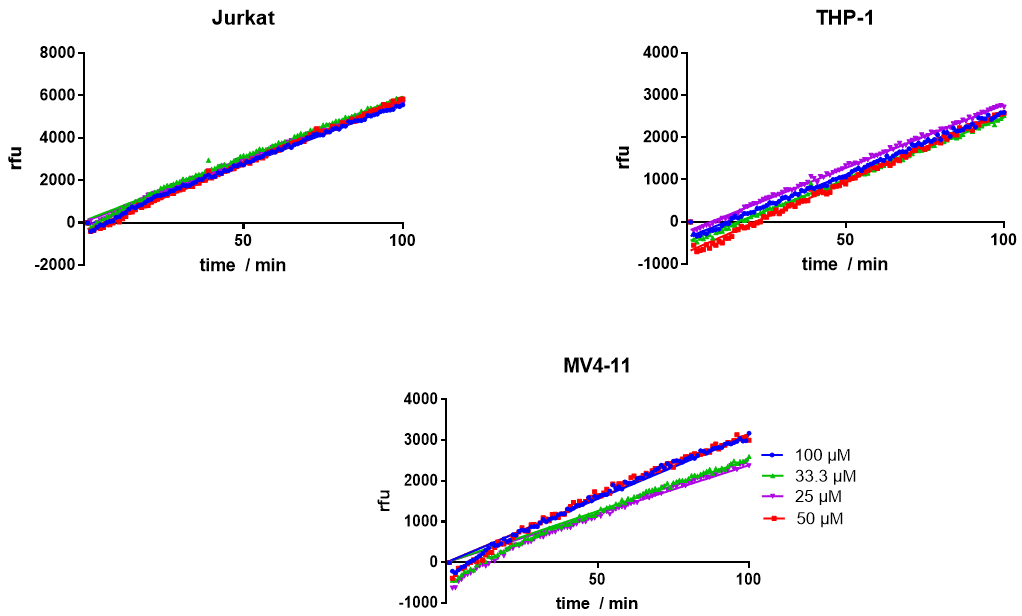


Abbildung 67. Umsetzung unterschiedlicher Konzentrationen des Substratpeptids **BSc5098** durch verschiedene Leukämiezelllinien (50.000 Zellen pro Well).

Interessanterweise variiert der Substratumsatz von **BSc5098**, im Gegensatz zu Suc-LLVY-AMC, nur gering mit der eingesetzten Konzentration und ist auch in Jurkat und THP-1 Zellen kaum abhängig von der Menge an vorhandenem Substrat. Das lässt darauf schließen, dass entweder die Substratkonzentration in der Zelle nicht mehr variiert, also die Diffusion des Substrats limitierend ist, oder das Proteasom mit Substrat gesättigt ist. Bemerkenswert ist außerdem, dass der Umsatz, während er für MV4-11 und THP-1 Zellen vergleichbar ist (~50 rfu / min) für Jurkat Zellen ungefähr doppelt so groß ist (~100 rfu / min). Der Z'-Wert lag dabei zwischen 0.82 und 0.96 (Kapitel 5.3.6). Wichtig ist außerdem, dass im Rahmen dieses Assays die Zellen nach dem Auslesen verworfen werden und dieses Assay am Ende der geplanten Inkubationsdauer anzuwenden ist, da nicht auszuschließen ist, dass das freiwerdende, fluoreszente AMC selbst zytotoxisch ist. Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass in Zukunft eine kommerzielle Entwicklung von selektiveren und besser Zell-permeablen Proteasom-Substraten anhand von **BSc5098** ins Auge gefasst werden sollte. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde dieses Assay verwendet, um den Zusammenhang der zytotoxischen Wirkung mit der Stärke der Proteasom-Inhibition in den Zellen zu korrelieren.

3.2.3 Molekulare Modellierung von Ketoamid-basierten Inhibitoren

Die computer-gestützte Optimierung der reaktiven Ketoamid-Gruppe erfolgte anhand der bekannten Proteasom-Kokristallstrukturen mit den peptidischen Aldehyden **MG132** und **BSc2118** und den peptidischen Ketoamiden **BSc2189** und **BSc4999** (Abbildung 68) in der β5-Untereinheit des yCP. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie und der einfacher zugänglichen Proteasomkristalle konnte dieses erfolgreich als Surrogat genutzt werden. Die Konformation der Peptidrückgrate und der *N*-terminale Carboxybenzyl-Schutzgruppe (Cbz) ist bei allen Inhibitoren ähnlich. Die Leucin-Seitenketten in P1 bis P3 liegen in den Taschen S1 bis S3 der β5-Untereinheit, wobei das Peptidrückgrat starke Wasserstoffbrückenbindungen mit der β5-Untereinheit eingeht und somit die Kopfgruppe des Inhibitors optimal in Richtung des nukleophilen Trh1O$^{\gamma}$ positioniert wird. Die Cbz-Gruppe liegt dabei in der S4-Tasche, die mit der β6-Untereinheit gebildet wird. Die Dimethylphenyl-Gruppe im Ketoamid **BSc4999** ist jedoch leicht in Richtung der *primed site* verschoben (~ 0.8 Å), da aufgrund der sterisch anspruchsvollen Dimethyl- und Phenyl-Gruppen nicht der gleiche *induced*

fit-Mechanismus nach Bildung des Halbketals möglich ist wie bei Bildung des Halbacetals durch Angriff an die Aldehyde. Während die Hydroxylgruppe des Halbacetals im Oxyanionen-Loch der Tasche liegt, die normalerweise durch das Amid-Sauerstoff-Atoms des Substrats ausgefüllt wird, ist die Hydroxylgruppe des Halbketals zur entgegen liegenden Seite gedreht, wobei die unveränderte Carbonyl-Gruppe der α-Ketoamide das Oxyanionen-Loch belegt und die Konformation der Kopfgruppe eingeschränkt wird. Die Position der Phenylgruppe der α-Ketoamide zeigt dabei hinter Thr1 in den gestrichenen Teil (*primed site*) des Substratbindekanals und ermöglicht somit, im Gegensatz zu Boronsäuren oder Epoxyketonen, die duale Belegung der gestrichenen und der nicht-gestrichenen Bindetasche, insbesondere von S1‘ (Abbildung 68). Somit stellt sich die Frage, ob die Einführung eines Restes in *ortho*-, *meta*- oder *para*-Substitution die Belegung der S1‘-Tasche erlaubt. Zudem sollte untersucht werden, ob die Kombination mit zusätzlichen Methyl-Gruppen, wie in der Entwicklung von **BSc4999** aus **BSc2189** angewendet, zu einer erhöhten Inhibition führt oder ob sie der Besetzung der S1‘- Tasche entgegensteht. Aus der Analyse der Cbz-Gruppe in P4 wird deutlich, dass diese keine gezielten Wechselwirkungen mit Resten der β5- oder β6-Tasche eingeht, wodurch hier ebenfalls ein Austausch zu einer höheren Aktivität führen kann.

Die Modellierung neuer Liganden erfolgte zu Beginn der Arbeit durch einfache Modifikation des gebundenen Liganden in der Kristallstruktur von **BSc4999** mit der Modellierungssoftware MOE, da das kovalente *de novo Docking* von Tripeptiden nur bei verschiedenen *Redocking*-Ansätzen von gelösten Kokristallstrukturen validiert ist, nicht jedoch bei einer *de novo* Modellierung. Die Diskussion der entsprechenden Problematik und die Entwicklung einer neuen *Docking*-Strategie für Tripeptide sind Bestandteil des Kapitels 3.3 und werden dort weiter ausgeführt.

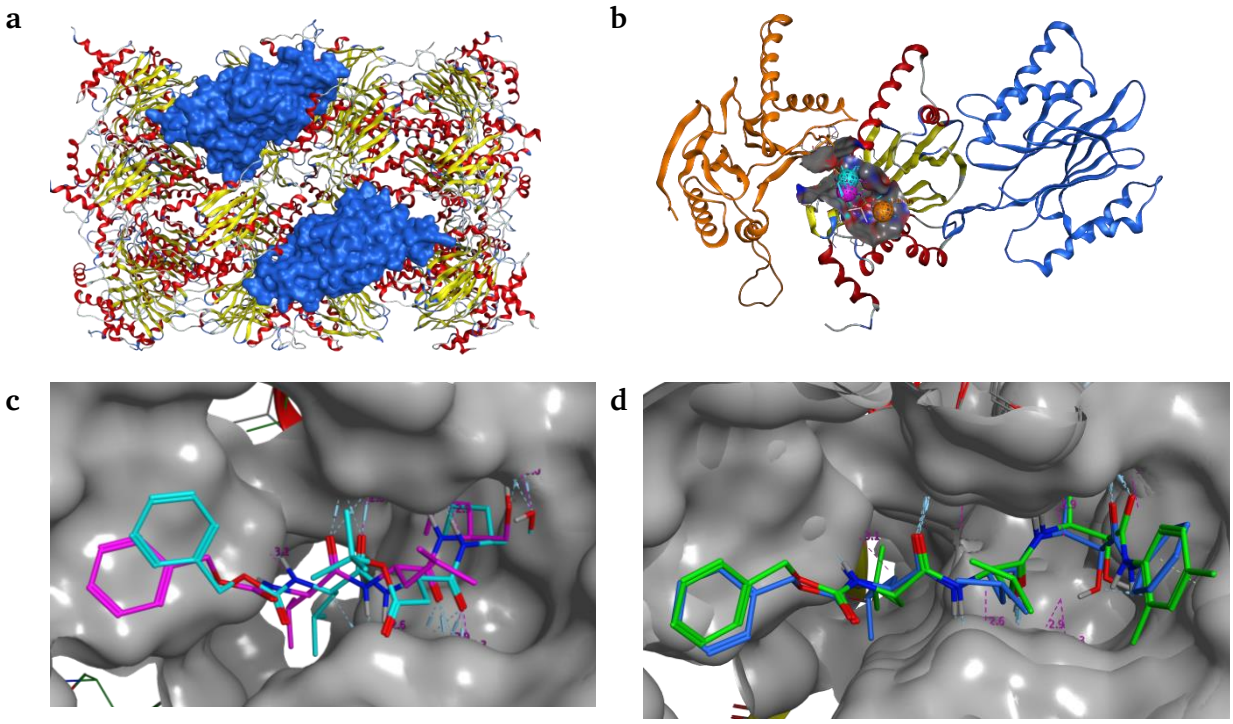


Abbildung 68. (a) Übersicht der Architektur des Proteasoms und Lage der β5-Untereinheiten im Kernpartikel. (b) Lage der aktiven Tasche der β5-Untereinheit (rot) zwischen β6 (orange) und β4 (blau). (c) Bindung der Peptidaldehyd Proteasom-Inhibitoren **MG132** (lila) und **BSc2118** (cyan) sowie (d) **BSc2189** (blau) und **BSc4999** (grün) in der β5-Untereinheit des yCP.

Aus der Analyse der Kristallstrukturen wird deutlich, dass die S1'-Tasche durch große Substituenten, wie beispielsweise Phenyl-Ringe, besetzt werden kann. Hierbei ist jedoch eine recht flexible Anknüpfung ratsam, die chemisch auch gut zugänglich ist, da es bisher keine Berichte über die Struktur-Aktivitätsbeziehungen aus der gestrichenen und der ungestrichenen Bindetasche gibt. Als Gruppe, um die Belegung der gestrichenen Bindetasche zu bestimmen, wurde die Phenylether-Gruppe gewählt. Diese ist synthetisch sowohl in *ortho*-, *meta*- als auch *para*-Stellung gut zugänglich und hat diverse lokale Energieminima, wodurch ein *induced fit* an die Tasche erlaubt wird. Dies wird durch die Modifikation von **BSc4999** in der Kokristallstruktur mit yβ5 deutlich. Um die Variation zu erlauben, wurden die Methyl-Gruppen entfernt, und mit der *Builder* Funktion von MOE der neue Substituent direkt in den Komplex eingezeichnet und die Energie des kovalent an das Proteasom gebundenen Liganden minimiert (Abbildung 69). Dabei werden in keiner der drei Substitutionen Konflikte mit der Oberfläche der Bindetasche erzeugt. Zudem wird in der *meta*-Substitution eine π-H-Interaktion durch eine *Edge-to-face* Wechselwirkung des Phenylethers mit Tyr170 in β5 deutlich, die einen zusätzlichen energetischen Vorteil des Protein-Ligand-Komplexes ermöglichen kann.

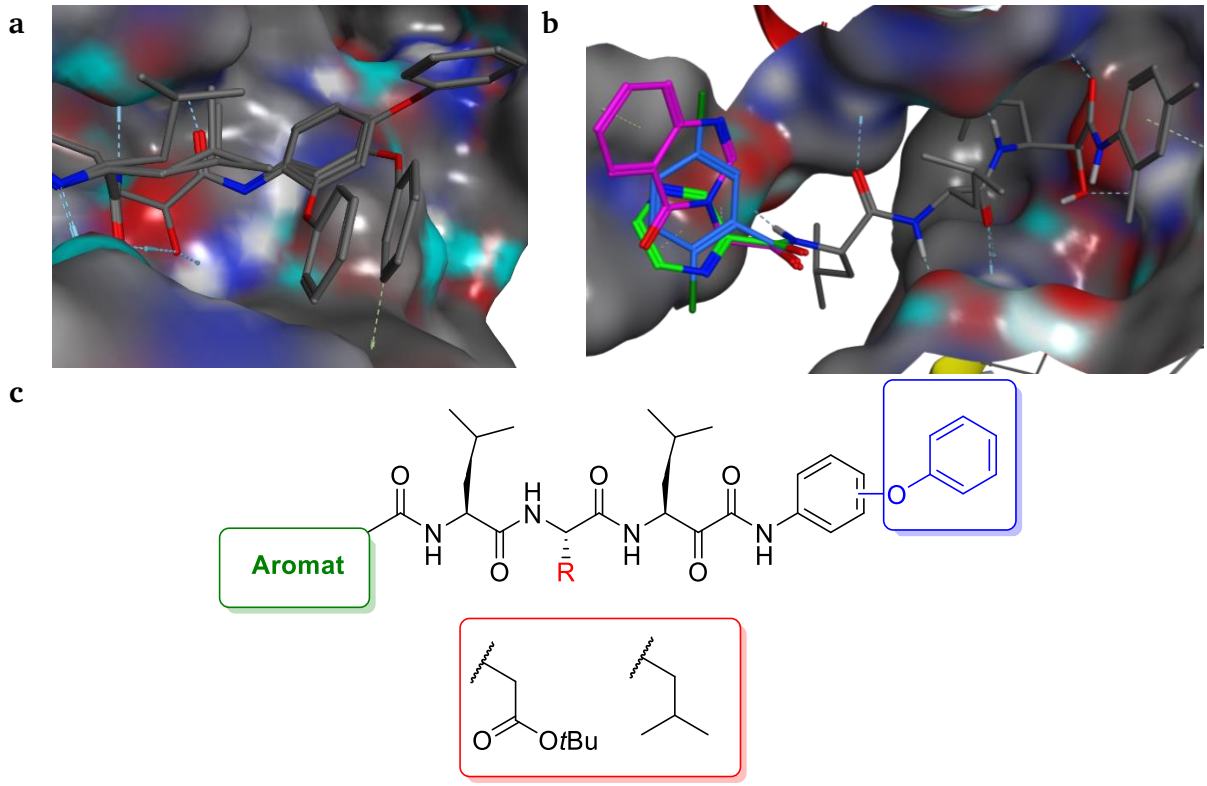


Abbildung 69. (a) Mögliche Positionen von *ortho*-, *meta*- und *para*-Phenoxy substituierten Ketoamiden in S1' und S2' der β5-Untereinheit. (b) Exploration der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen möglicher Substituenten der P4-Einheit von Ketoamid-basierten Proteasom-Inhibitoren. (c) Übersicht der Exploration von Struktur-Aktivitätsbeziehungen in diesem Teilprojekt.

Dabei erfolgt die Exploration der Struktur-Aktivitätsbeziehungen in einem iterativen Zyklus aus Synthese und biochemischer Evaluierung. Aufgrund der Komplexität des Teilprojekts erfolgten die organischen Synthesen der in Tabelle 10 und 11 aufgeführten Substanzen durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe Schmidt, während die beschriebene molekulare Modellierung und die biochemischen Experimente im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden.

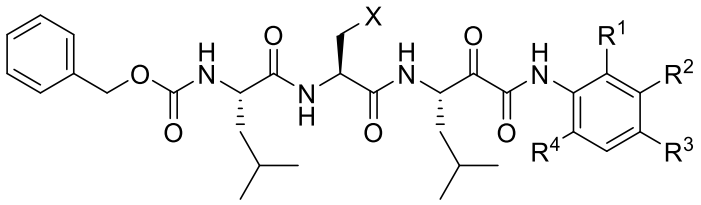
3.2.4 Pharmakologische Evaluierung der Proteasom-Inhibitoren

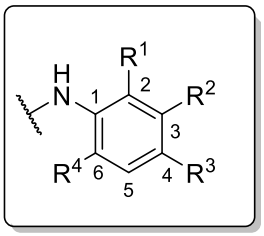
Zur Einschätzung des Einflusses der Modifikationen der Leitstruktur **BSc4999** wurde zunächst zum einen die Konzentration der halbmaximalen Inhibition der Zellviabilität (IC_{50}) in MV4-11 Zellen, analog zur Durchführung im Kapitel 3.1, als auch eine Ein-Punkt-Messung der Proteasom-Inhibition bei 100 nM Inhibitor durchgeführt. Die Zytotoxizität der *ortho*- (**BSc5321**, IC_{50} = 203 ± 22 nM), *meta*- (**BSc5322**, IC_{50} = 18 ± 3 nM) und *para*-Phenylether (**BSc5323**, IC_{50} = 45 ± 3 nM) substituierten

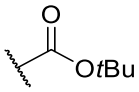
Ketoamide zeigten, dass prinzipiell alle Positionen eine solche Substitution tolerieren, die Einführung der *meta*-Phenylether-Gruppe jedoch am besten toleriert wird. Die Aktivität im zellulären Assay korreliert dabei mit der Aktivitätsbestimmung gegenüber isoliertem cCP, bei der ebenfalls die *meta*-Phenylether-Gruppe die höchste Aktivität zeigt (β5c-Inhibition 56%, Tabelle 10). Wie bei **BSc4999** ist auch hier die Inhibition von β5c gegen β5i deutlich stärker. Die zelluläre Aktivität ist jedoch nur leicht erhöht gegenüber **BSc4999** (IC_{50} = 19 ± 3 nM), weshalb die Methylgruppen in *ortho*- und *para*-Position wieder eingeführt und mit der *meta*-Phenylether Substitution kombiniert wurden. Hierbei ergaben sich in der Modellierung jedoch keine eindeutigen Hinweise auf ein besonders geeignetes Substitutionsmuster, weshalb verschiedene Kombinationen synthetisiert und zur Testung bereitgestellt wurden.

Während das 1,2,3,4-substituierte Ketoamid **BSc5359** eine etwas schlechtere zelluläre Aktivität (IC_{50} = 19 ± 1 nM) und Proteasom-Inhibition (β5c: 46%; β5i: 12%) als **BSc5322** zeigt, ist diese durch 1-, 3-, 4-, 6-Substitution im Ketoamid ähnlich stark (IC_{50} = 19 ± 1 nM), wobei die Selektivität der Inhibition von β5c (46%) gegenüber β5i (12%) erhöht ist. Die mono-Methyl Substitutionen in 2- (**BSc5357**, IC_{50} = 27 ± 8 nM) und 4-Position (**BSc5358**, IC_{50} = 23± 2 nM) verringern die zytotoxische Aktivität und Selektivität der β5c Inhibition gegenüber β5i. Die mono-Methyl-Substitution in 6-Position in **BSc5356** führt zu einer deutlichen Verringerung der Proteasom-Inhibition (β5c: 26%; β5i: 19%), wobei die zytotoxische Wirkung jedoch erhöht ist (IC_{50} = 16 ± 1 nM). Anhand des Vergleichs von **MG132** und **BSc2118** wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass die Inhibitionsstärke von Peptidaldehyden durch Einführung des *tert*-Butyl-Esters der Asparaginsäure-Seitenkette (AspO*t*Bu) in P2 gegenüber β5c erhöht wird. Da es in der β5c-Untereinheit jedoch keine definierte P2-Tasche gibt ist die Inhibition vermutlich durch unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen durch die größere Moleküloberfläche und möglicherweise auch durch die Verdrängung von Wasser in der S2-Tasche erhöht.

Tabelle 10. Übersicht der zytotoxischen Aktivität und der Proteasom-Inhibition der evaluierten Inhibitoren.





Verbindung	X	R^1	R^2	R^3	R^4	IC_{50} MV4-11 / nM	Rel. Inhibition (c = 100 nM) β5c	β5i
Bortezomib	-	-	-	-	-	34 ± 5	89%	85%
Carfilzomib	-	-	-	-	-	3.6 ± 1.8	86%	43%
BSc4999		Me	H	Me	H	19 ± 3	64%	33%
BSc5321		OPh	H	H	H	203 ± 22	12%	8%
BSc5322		H	OPh	H	H	18 ± 3	56%	23%
BSc5323		H	H	OPh	H	45 ± 3	25%	5%
BSc5359		H	OPh	Me	Me	19 ± 1	46%	12%
BSc5360		Me	OPh	Me	H	26 ± 8	20%	9%
BSc5358		H	OPh	Me	H	23 ± 2	49%	28%
BSc5357		Me	OPh	H	H	27 ± 8	41%	29%
BSc5356		H	OPh	H	Me	16 ± 1	26%	19%
BSc5327		H	H	H	H	46 ± 6	57%	48%
BSc5328		Me	H	Me	H	46 ± 1	43%	36%
BSc5324		OPh	H	H	H	76 ± 14	28%	18%
BSc5325		H	OPh	H	H	36 ± 5	53%	43%
BSc5326		H	H	OPh	H	68 ± 9	41%	40%
BSc5377		H	OPh	Me	Me	297 ± 27	33%	28%

In der Tat konnte auch eine stärkere zytotoxische Wirkung von **BSc2118** in MV4-11 Zellen (IC_{50} = 123 ± 12 nM) gegenüber **MG132** (IC_{50} = 131 ± 12 nM) festgestellt werden, wobei sowohl die Inhibition gegen β5c (54%) als auch β5i (11%) erhöht ist. Dadurch stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auch durch Austausch der Leucin-Seitenkette in P2 mit AspO*t*Bu beobachtet werden kann. Die Synthese erfolgte wiederum durch Kollegen und analog zu den Ketoamiden in einer Passerini-Reaktion und werden zur biochemischen Testung im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Interessanterweise ist für alle Substanzen eine geringere Aktivität im Vergleich zu den analogen Leucin-Derivaten zu beobachten, wobei die Trends ähnlich sind. So ist das *meta*-Phenylether substituierte Ketoamid (**BSc5325**, IC_{50} = 36 ±5 nM) deutlich aktiver als die entsprechenden *ortho*- (**BSc5324**, IC_{50} = 76 ± 14 nM) und *meta*-substituierten Ketoamide (**BSc5326**, IC_{50} = 68 ± 9 nM), wobei das *ortho*-substituierte

Ketoamid in dieser Serie aktiver ist. Während die *ortho*- (12% zu 28%, 100 nM Inhibitor) und *para*-Phenylether (25% zu 41%) substituierten Ketoamide aktiver gegen β5c als ihre Leucin-Analoga sind, ist die Inhibition durch das *meta*-substituierte Derivat vergleichbar (56% zu 53%) und die höchste in dieser Serie. Die Inhibition von β5i hingegen ist deutlich erhöht und führt zu einer Verringerung der Isoform-Selektivität, was insbesondere für das aktivste Derivat **BSc5325** zu beobachten ist (23% zu 43% Inhibition). Interessanterweise wird durch die Wiedereinführung der Methyl-Gruppen in 4- und 6-Position die zelluläre Aktivität deutlich verringert, was an einer schlechteren Penetration der Zellmembran und einer Einlagerung in diese liegen kann. Ähnliche Effekte wurden von Groll et al. bei der Optimierung von Cbz-geschützten Dicyclohexyl-basierten Proteasom-Inhibitoren beobachtet. Durch Austausch der Cbz-Schutzgruppe mit einer Solvens-exponierten Morpholin-Gruppe nach dem P4-Rest konnte die Löslichkeit und die zelluläre Aktivität deutlich gesteigert werden.[224]

Ein möglicher Grund für die geringere Aktivität, die im Gegensatz zu den Aldehyden beobachtet wird, könnte eine leichte Verschiebung des Peptid-Rückgrats sein, das in den vorgestellten Kokristallstrukturen beobachtet werden kann (Abbildung 68). Die Phenylamid-Gruppe verhindert die gleiche Nähe des elektrophilen Kohlenstoffs zu Thr1 wie der Aldehyde, wodurch der *induced fit* möglicherweise nicht mehr in diesem Mechanismus möglich ist und eine weniger günstige Platzierung des sterisch anspruchsvollen *tert*-Butyl-Rest resultiert.

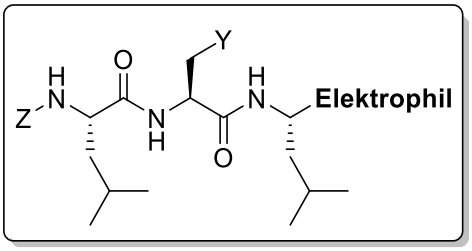
Der nächste Optimierungsschritt besteht im Austausch der *N*-terminalen Cbz-Schutzgruppe, die in P4 des Inhibitors in direkter Nachbarschaft zur β6-Untereinheit liegt. Es wird vermutet, dass eine geringere Anzahl an frei drehbaren Bindungen und die Einführung zusätzlicher polarer Wechselwirkungen die Aktivität und die Zellpermeabilität verbessert und einen alternativen *induced fit* Mechanismus in der Bindetasche ermöglicht. Dazu sollten drei verschiedene P4-Gruppen eingeführt werden, die von bereits bekannten Inhibitoren inspiriert sind. **Ixazomib** besitzt *N*-terminal einen 2,5-Dichlorbenzamid Rest nach P2, der ähnlich zu der 2-Pyrazinamid-Gruppe in **Bortezomib** ist, sich jedoch sterisch und elektronisch unterschiedlich auswirken kann. Zusätzlich soll ausgetestet werden, ob bizyklische Ringe in P4 toleriert werden. Dazu wird eine Chinazolinon-Gruppe eingeführt, die mit P3 über eine Acetyl-Gruppe

verknüpft ist, und von einer bizyklischen *N*-terminalen Gruppe abgeleitet ist, die von Micale et al. im Rahmen der Optimierung dipeptidischer Boronsäure-Inhibitoren des Proteasoms eingeführt wurde.[225]

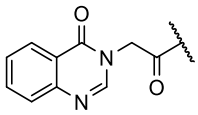
Um die Plausibilität dieser Änderungen einzuschätzen, wurde die kokristallisierte Struktur von **BSc4999** wie bei der Exploration der Phenylether-Substituenten in der aktiven Tasche mit nachfolgender Energieminimierung des Liganden durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass alle drei Reste ähnlich wie die Cbz-Gruppe in die P4-Tasche passen, wobei das Amid-NH der P4-Gruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit der Asp126 Seitenkette der β6-Untereinheit eingeht. Zusätzlich kann R^1 π-H-Wechselwirkungen mit Pro127 der β6-Untereinheit eingehen, während R^2 zwei π-H-Interaktionen mit der Val128-Seitenkette der β6-Untereinheit eingeht.
Die Synthese der beschriebenen Zielstrukturen erfolgte dabei durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe und sei hier nur kurz dargestellt. Der Austausch der Cbz-Schutzgruppe zu Amiden erfolgte durch katalytische Hydrierung der Cbz-Schutzgruppe auf Stufe der Tripeptidalkohole, wobei die korrespondierenden Aminoalkohole entstehen. Diese wurden mit Standard-Peptidkupplungsmethoden und den korrespondierenden Säuren in die entsprechenden Amide überführt, die anschließend mit IBX zum Peptidaldehyd oxidiert wurden. Diese stellen zum einen die Zielverbindungen dar, erlauben aber auch die Umsetzung zu den P4-substituierten Ketoamiden durch die bereits beschriebene Passerini-Reaktion.
Das 2,5-Dichlorbenzamid-substituierte Derivat **BSc5373** (MV4-11 IC_{50} = 16 ± 1 nM) erhöht die cytotoxische Wirkung der Aldehyde im Vergleich zu **MG132** (IC_{50} = 131 ± 12 nM) massiv, während das bizyklische Derivat inaktiv ist (**BSc5372**, IC_{50} > 1000 nM). Die Substitution mit dem Pyrazin-Derivat ergibt keine vorteilhafte zytotoxische Aktivität (**BSc5374**, IC_{50} = 145 ± 23 nM). Die beobachteten Aktivitäten korrelieren dabei mit der Stärke der Proteasom-Inhibition, wobei die Selektivität durch die aktivste Substanz **BSc5373** zwischen den Isoformen geringer ist (β5c: 76%; β5i: 60%; Inhibition bei 100 nM Inhibitor). Die Substitution mit Asp*O*tBu in P2 zum R^3-substituierten Aldehyd **BSc5380** (IC_{50} = 28 ± 5 nM) erhöht ebenso die zytotoxische Aktivität gegenüber dem P2-Leucin-Derivat **BSc2118** (IC_{50} = 123 ± 12 nM), wobei sie, ähnlich der bisher beschriebenen Ketoamid-Serie, weniger aktiv ist als das Leucin-Gegenstück **BSc5373**. Anschließend wurden die Bemühungen zur Exploration der

Struktur-Aktivitätsbeziehung in P1‘, P2 und P4 kombiniert, um die Proteasom-Inhibition und die zytotoxische Aktivität weiter zu erhöhen. In Übereinstimmung mit den Struktur-Aktivitätsbeziehungen, die bisher beobachtet wurden, ist das 3-Phenoxy-4,6-dimethyl-Derivat **BSc5376** die potenteste Verbindung des gesamten Projekts, sowohl in MV4-11 Zellen (IC_{50} = 7.4 ± 2.6 nM), als auch in der Inhibition von β5c (83%), wobei die Inhibition von β5i (58%) mit dem Aldehyd **BSc5373** vergleichbar ist. Die Kombination des 2,4-Dimethyphenylketoamids mit der R3-Gruppe in P4 (**BSc5375,** IC_{50} = 25 ± 5 nM**)** zeigt hingegen keinen Vorteil gegenüber **BSc4999**. In Übereinstimmung mit den bisherigen Trends zeigt die Substitution von Leucin in P2 durch AspOtBu eine geringere Inhibition des Proteasoms sowohl mit voller Besetzung der S1‘ Tasche (**BSc5379,** IC_{50} = 58 ± 10 nM) als auch mit der ursprünglichen 2,4-Dimethylphenyl-Substitution (**BSc5378,** IC_{50} = 58 ± 10 nM). Die Wirkung der Leitstruktur **BSc5376** in MV4-11-Zellen liegt dabei in einer ähnlichen Größenordnung wie **Carfilzomib** (IC_{50} = 3.6 ± 1.8 nM), das jedoch eine irreversible Inhibition hervorruft. Die Wirkung ist dabei deutlich stärker als bei dem ebenfalls kovalent-reversibel bindenden und zur klinischen Anwendung zugelassen **Bortezomib** (IC_{50} = 34 ± 5 nM**).**

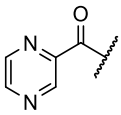
Tabelle 11. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der P4-variierten Aldehyde und der 2,5-Dichlorbenzamid-substituierten *meta*-Phenylether Ketoamide.



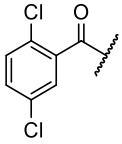
R^1 =

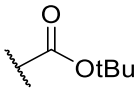
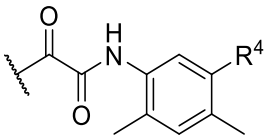
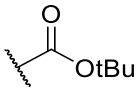


R^2 =



R^3 =



Verbindung	Elektrophil	Y	Z	R^4	IC_{50} MV4-11 / nM	Rel. Inhibition (c =100 nM) β5c	β5i
MG132			Cbz	-	131 ± 12	43%	6%
BSc5372			R^1	-	> 1000	6%	11%
BSc5374			R^2	-	145 ± 23	30%	4%
BSc5373			R^3	-	16 ± 1	76%	60%
BSc2118			Cbz	-	123 ± 12	54%	11%
BSc5380			R^3	-	28 ± 5	64%	38%
BSc5375			R^3	H	25 ± 5	25%	4%
BSc5376			R^3	OPh	7.4 ± 2.6	83%	58%
BSc5378			R^3	H	47 ± 5	26%	35%
BSc5379			R^3	OPh	58 ± 10	26%	8%

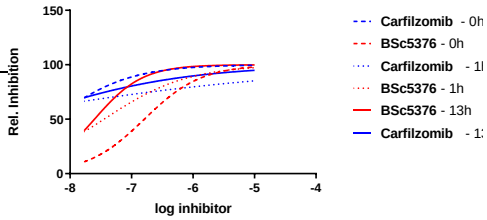
Um die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der untersuchten Ketoamide besser zu verstehen, wurden die zytotoxischen Effekte in weiteren Leukämiezelllinien bestimmt und die intrazelluläre Inhibition des Proteasoms untersucht. Entscheidend hierbei ist der Vergleich der Ausgangsverbindung **BSc4999** und der Leitstruktur **BSc5376** sowie des P1'-verlängerten Inhibitors **BSc5322**. Diese sollten mit dem β5c-selektiven, klinisch zugelassenen Inhibitor **Carfilzomib** verglichen werden.

Carfilzomib zeigt hierbei eine stärkere Inhibition der MV4-11 Zellviabilität (IC_{50} = 3.6 ± 1.8 nM) als die Ketoamide, was aber aufgrund des irreversiblen Bindungsmodus und des optimierten Tetrapeptid-Motivs anstelle der synthetisch einfacheren Leucin-Reste zu erwarten war und zudem mit der Inhibition des isolierten Proteasoms (Abbildung 36a) korreliert. In Jurkat-Zellen ist die zytotoxische Wirkung von **BSc5322** (IC_{50} = 24 ± 4 nM), ähnlich zur Wirkung in MV4-11 Zellen, etwas größer als von **BSc4999** (IC_{50} = 30 ± 0.3 nM), wobei **BSc5376** (IC_{50} = 11 ± 1 nM) wieder die stärkste

zytotoxische Aktivität zeigt. **Carfilzomib** ist hier jedoch weniger zytotoxisch als **BSc5376** (IC_{50} = 14 ± 3 nM). Dies kann eine Folge des erhöhten Proteasom-Umsatzes sein, wie anhand der Assay-Optimierung in Kapitel 3.2.2 beobachtet wurde, eine unterschiedliche Expression der β5c- und der β5i-Isoformen oder eine Desaktivierung von **Carfilzomib**, beispielsweise durch ein erhöhtes GSH-Level, wodurch das Cystein-S der GSH-Seitenkette und nicht Thr1 als Nukleophil agiert und den Epoxid-Ring öffnet.

a

Verbindung	Zellviabilität IC_{50} / nM		
	MV4-11	THP-1	Jurkat
Carfilzomib	3.6 ± 1.8	135 ± 39	14 ± 3
BSc5376	7.4 ± 2.6	66 ± 1	11 ± 1
BSc5322	18 ± 3	30 ± 10	24 ± 4
BSc4999	19 ± 3	24 ± 0.1	30 ± 0.3



b

Inhibition der intrazellulären Umsetzung von Z-LD(OtBu)A-AMC									
	MV4-11			Jurkat			THP-1		
	0 h	1 h	13 h	0 h	1 h	13 h	0 h	1 h	13 h
7	137	38	92	176	107	107	304	121	215
9	631	43	22	1.200	70	16	1000	67	44
27	162	12	8	214	20	10	228	84	84
3	5	1	1	15	1	1	36	53	98

Abbildung 70. (a) Vergleich der zytotoxischen Wirkung der zentralen Proteasom-Inhibitoren. (b) Zeitabhängigkeit der intrazellulären Proteasom-Inhibition durch reversible und irreversible Inhibitoren. (c) Übersicht der zeitabhängigen intrazellulären Proteasom-Inhibition in verschiedenen Zelllinien.

Die intrazelluläre Proteasom-Inhibition wurde bei unterschiedlichen Vorinkubations-Zeiten des Inhibitors mit der entsprechenden Zelllinie untersucht. Dabei wurde, in Anlehnung an Kapitel 3.2.1, das neu entwickelte Assay durch Umsetzung des künstlichen Substratpeptids **BSc5098** verwendet. Hierbei werden jedoch 25.000 Zellen pro *Well* bei einer Substratkonzentration von 30 μM verwendet, damit das Assay ökonomischer und effizienter durchführbar ist. Der Z'-Wert liegt dabei, abhängig von der getesteten Zelllinie und der Inkubationszeit, zwischen 0.69 und 0.95 (siehe Kapitel 5.3.6).

In MV4-11 Zellen zeigt **Carfilzomib** eine schnelle, fast vollständige Inhibition der Substrat-Umsetzung, selbst wenn Substrat und Inhibitor zur gleichen Zeit den Zellen zugesetzt werden und nur für 30 min vor dem Start des Fluoreszenz-*Readout* inkubiert wurden (IC_{50} = 5 nM). Die Inhibition des Proteasom-Umsatzes steigt mit 1 h Vorinkubationszeit vor Substrat-Zugabe (IC_{50} = 1 nM) noch einmal an und bleibt auch nach 13 h Inkubationszeit (IC_{50} = 1 nM) bestehen. Im Gegensatz zur schnellen Wirkung

des irreversiblen Inhibitors fängt die Inhibition durch die reversiblen Ketoamide deutlich langsamer an. **BSc5376** zeigt hierbei eine deutlich stärkere Inhibition als **BSc5322** bei allen Zeitpunkten, wobei bei beiden Inhibitoren die Inhibitionsstärke mit steigender Inkubationszeit zunimmt und die beobachtete Proteasom-Inhibition bei 13 h (**BSc5376** IC_{50} = 8 nM; **BSc5322** IC_{50} = 22 nM) mit der zytotoxischen Wirkung korreliert. Die langsame Zunahme könnte entweder in einer geringeren Zellpermeabilität oder einer langsameren Assoziationsrate an das aktive Zentrum im Gegensatz zu **BSc4999** begründet sein, da zusätzlich S1‘ besetzt wird. **BSc4999** zeigt nach einer Zunahme der Inhibition nach 1 h Inkubationszeit (0 h: IC_{50} = 137 nM; 1 h: IC_{50} = 38 nM) jedoch eine Abnahme nach 13 h (IC_{50} =92 nM), was an einer schnelleren Dissoziation von dem aktiven Zentrum liegen kann, da die S1‘-Tasche nicht besetzt ist und somit eine weniger nachhaltige Inhibition erfolgen könnte. Ein ähnlicher Trend kann für die Proteasom-Inhibition in Jurkat-Zellen beobachtet werden. Hier zeigt **Carfilzomib** wiederum die stärkste Inhibition bei allen Vorinkubations-Zeiten, während die Ketoamide einen langsameren Beginn der Inhibition zeigen, der nach 13 h in Jurkat-Zellen (**BSc5376** IC_{50} = 10 nM; **BSc5322** IC_{50} = 16 nM) ähnlich ausgeprägt ist wie in MV4-11 Zellen, wobei **BSc4999** wieder am wenigsten wirksam ist (IC_{50} = 107 nM). Während die Zytotoxische Wirkung für **BSc4999** und **BSc5322** mit der relativen Stärke der Proteasom-Inhibition korreliert, zeigt sich für **Carfilzomib**, trotz der stärkeren Inhibition der zellulären Proteasom-Aktivität (IC_{50} = 1 nM), eine etwas geringere zytotoxische Wirkung (IC_{50} = 14 ± 3 nM) als für **BSc5376** (IC_{50} = 11 ± 1 nM).

In THP-1 Zellen stellt sich sowohl die Stärke der Proteasom-Inhibition als auch die zytotoxische Wirkung der getesteten Inhibitoren gänzlich unterschiedlich dar.

Während bei kurzen Inkubationszeiten die Inhibition des Proteasoms durch **Carfilzomib** am stärksten ist, nimmt sie im Verlauf rapide ab (0 h: IC_{50} = 36 nM, 1 h: IC_{50} = 53 nM) und ist nach 13 h niedriger als die der Phenylether-Ketoamid-basierten Proteasom-Inhibitoren (IC_{50} = 98 nM). Dies wird auch anhand der zytotoxischen Wirkung deutlich, bei der **Carfilzomib** die schwächste Wirkung hat (IC_{50} = 135 ± 39 nM). **BSc5376** zeigt einen Anstieg der Inhibition nach 1 h (IC_{50} = 84 nM), die jedoch stagniert und entsprechend nur eine moderate zytotoxische Wirkung erzeugt (IC_{50} = 66 ± 1 nM). **BSc5322** zeigt erneut einen sehr langsamen Anstieg der intrazellulären Proteasom-Inhibition, die jedoch nach 13 h die Höchste der Serie ist (IC_{50} = 44 nM). In der zytotoxischen Wirkung ist **BSc5322** (IC_{50} = 30 ± 10 nM) jedoch

schwächer als **BSc4999** (IC_{50} = 24 ± 0.1 nM). **BSc4999** zeigt erneut die geringste Proteasom-Inhibition nach 1 h (IC_{50} = 121 nM) und 13 h (IC_{50} = 215 nM).

Der Grund hierfür liegt vermutlich in der höheren Expression des iCP, das deutlich schwächer von **Carfilzomib** inhibiert wird als das cCP, was vereinzelt in der Literatur beschrieben ist.[226-227] Zudem ist ein Resistenzmechanismus denkbar, nachdem sich die Zusammensetzung des Proteasoms ändert, indem mehr β5i-Untereinheiten eingebaut werden und somit nach initialer Wirkung durch **Carfilzomib** und **BSc5376** eine partielle Resistenz entsteht.
Dies ist umso bemerkenswerter, als dass sowohl THP-1 als auch MV4-11 Zellen akute monozytische Leukämien darstellen, also die gleichen Vorläuferzellen der Granulozyten bzw. Makrophagen betreffen. In weiteren Arbeiten sollte eine größere Auswahl an selektiven β5c- und β5i-Inhibitoren mit unterschiedlichen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften sowohl in der zeitabhängigen zytotoxischen Wirkung als auch in der zellulären Proteasom-Inhibition untersucht werden. In der klinischen Entwicklung muss diese unterschiedliche Sensitivität von Leukämiezellen berücksichtigt und im Rahmen der personalisierten Medizin auch das Design klinischer Studien kritisch betrachtet werden. Zudem sollte die Expression und Zusammensetzung des Proteasoms, also die Verteilung der β5c/i, β2c/i und β1c/i von der Art der Leukämie und als Antwort der Zelle auf Proteasom-Inhibition in weiteren Arbeiten untersucht werden, da offensichtlich die rein klinische Gruppierung in beispielsweise akute oder chronische Leukämien zu kurz greifen könnte. Somit müssen weitere Untergruppen der Behandlung definiert werden, um eine optimal Therapieantwort zu erhalten.

3.2.5 Entwicklung einer Strategie zum kovalenten *de novo Docking* von peptidischen Proteasom-Inhibitoren

Aufgrund des überraschenden Vorteils der *meta*-Phenylether-substituierten Leitstruktur **BSc5376** gegenüber **BSc5322** und **BSc4999**, der nicht durch das ursprüngliche *Docking*-Modell erklärt werden konnte, sollte eine Strategie zum kovalenten *Docking* entwickelt werden, damit differenzierte Bindungshypothesen generiert werden können. Damit soll die deutlich höhere zelluläre Aktivität und die stärkere Proteasom-Inhibition erklärt werden und gleichzeitig die strukturbasierte Hypothesenentwicklung zur Entwicklung potenterer Inhibitoren, die die gestrichene Bindetasche besetzen, ermöglicht werden.

In den letzten Jahren gab es viele verschiedene Ansätze, die Bindung von Proteasom-Inhibitoren zu modellieren, die jedoch allesamt Vereinfachungen anwenden, die einer universellen Strategie und einem möglichst unvoreingenommenen *Docking*-Experiment entgegenstehen. So wurde beispielsweise das *Docking* von dipeptidischen Boronaten ähnlich zu **Bortezomib**, als auch nicht-peptidischen Boronaten basierend auf der bekannten Konformation und somit einem ähnlichen Ansatz wie im vorigen Kapitel verwendet.[225] Ein weiteres Beispiel stellt das kovalente *Docking* von peptidischen Ketoamiden, die auf die HCV Serin-Protease zielen, dar. In diesem Ansatz, der die *Schrödinger Suite* verwendet, wurde das gesamte Peptidrückgrat konstant gehalten und nur Seitenketten modelliert.[192] Ein weiteres Beispiel ist das *Docking* von **MG132** und der verwandten Struktur **MG101**, wo der Bindungsmechanismus der elektrophilen Kopfgruppe nicht in das *Docking* mit aufgenommen wurde.[228] Während der Entwicklung von **BSc4999**, als das DOCKTITE-Skript noch nicht zur Verfügung stand, wurde das Peptidrückgrat unverändert gehalten und nur die Bindung der elektrophilen Kopfgruppe evaluiert.

Komplett unvoreingenommenes, *de novo Docking* von tripeptidischen Inhibitoren ist somit in der Literatur nicht beschrieben und anspruchsvoll, da die Flexibilität und Größe der Liganden im Gegensatz zu beispielsweise heteroaromatischen Kinase-Inhibitoren massiv erhöht ist. Außerdem ist, bedingt durch die Architektur des Proteasoms, ein Großteil der Bindungstasche Solvens-exponiert und erlaubt somit in Kombination mit der hohen Anzahl frei drehbarer Bindungen der peptidischen Liganden, insbesondere im Gegensatz zu typischen heteroaromatischen Grundgerüsten,

viele *Docking*-Positionen außerhalb der S1 – S4 Bindetaschen. Zudem hat bisher noch kein *Docking*ansatz die Besetzung von S1‘ erprobt.

Zur Validierung von DOCKTITE wurde auch eine Reihe von Proteasom-Inhibitoren in *Redocking*-Experimenten erfolgreich modelliert (RMSD = < 2.0 Å, beispielsweise das tripeptidische Vinylsulfonamid **LU-122**).

Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Konformation des Liganden, die aus der Kokristallstruktur resultiert, unverändert als Eingangsstruktur für das *Docking* verwendet wird und somit *per se* eine hohe Erfolgswahrscheinlichkeit, diese Position im *Docking* wieder zu finden, garantiert. Außerdem hat **LU-122** eine geringere Anzahl von frei drehbaren Bindungen und enthält polare Aminosäure-Seitenketten, deren resultierende Wasserstoffbrückenbindungen energetisch vorteilhafter sind als hydrophobe Wechselwirkungen durch die Leucin-Reste der Ketoamide in diesem Teilprojekt. Zudem ist dieser Ansatz für nicht-kokristallisierte Inhibitoren und insbesondere die prospektive Entwicklung von Inhibitoren nicht nutzbar.

Um dieses Problem zu adressieren wird, wie im vorherigen Kapitel, eine Pharmakophor-gestützte *Docking*-Strategie benutzt, die anhand eines unvorein-genommenen *Redocking* von **BSc4999** validiert wird. Als erster Ansatz wurde dabei die Konformation von **BSc4999** aus der Kokristallstruktur extrahiert und das Halbketal-Addukt zu ursprünglichen Ketoamid-Struktur geändert. Das *Redocking* dieser Struktur führte zu einer sehr genauen Reproduktion der im Kristall gefundenen Konformation, wobei die am höchsten bewertete (London dG) Position einen RMSD-Wert von nur 1.3 Å aufwies. Dass diese Strategie, wie beschrieben, kein prädiktives Modellierung erlaubt ist an einem Beispiel dargestellt. Dafür wurde eine zufällige, lokal energieminimierte Konformation von **BSc4999** als Startkonformation für das *Docking* gewählt (Abbildung 71c) und ebenfalls mit DOCKTITE kovalent gedockt. Hierbei wurde jedoch keine Position von **BSc4999** mit einem RMSD von weniger als 2.0 Å erhalten, was gemeinhin als Kriterium für robuste Remodellierung angenommen wird, wobei die Pose mit der niedrigsten Energie einen RMSD-Wert von 5.2 Å zum **BSc4999** Komplex aufwies (Abbildung 71d).

Deshalb wurde eine neue *Screening*-Strategie entwickelt um die robuste Modellierung von kovalent-bindenden, tripeptidischen Proteasom-Inhibitoren zu ermöglichen. Diese ist außerdem in ihrem Grundsatz auf andere Liganden-Grundgerüste und Zielproteine anwendbar.

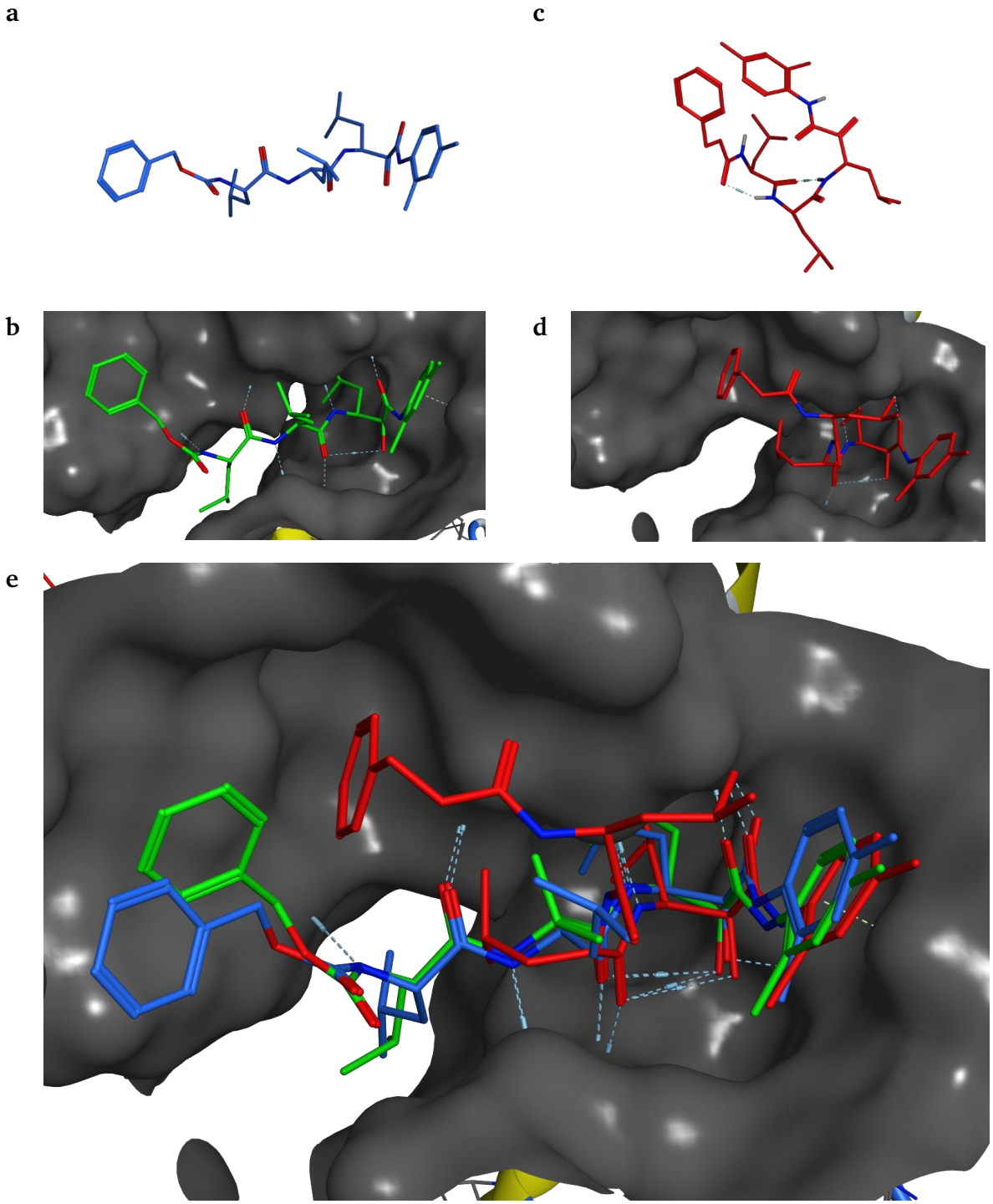


Abbildung 71. Ausgangs-Konformationen des kovalenten *Docking* von **BSc4999**: (a) Native und (b) zufällig ausgewählte Konformation. (c) Höchst-bewertete *Docking*-Position des *Redocking* der nativen Konformation von **BSc4999** (London dG, RMSD =1.3 Å). (d) Höchst-bewertete *Docking*-Position des *Redocking* der zufälligen Konformation von **BSc4999** (London dG, RMSD =5.2 Å). (e) Überlagerung der kokristallisierten Struktur von **BSc4999** (blau), und die am höchsten-bewerteten *Docking*-Strukturen ausgehend von der nativen Startkonformation (grün) und einer zufällig ausgewählten Startkonformation (rot).

Hierbei wurden zuerst verschiedene Inhibitorkonformationen gesammelt, um eine möglichst breite Grundlage energieminimierter Strukturen einer zweidimensional gezeichneten Struktur als Eingangsstrukturen für das kovalente *Docking* zu erhalten. Dabei wurde zuerst eine stochastische Suche nach Konformationen des freien Liganden durchgeführt, die enthaltenen Ketoamid-Kopfgruppen markiert und die nukleophile Seitenkette wie bisher verknüpft. Für **BSc4999** wurden somit 624 Konformationen erhalten, die nach Anknüpfung an die prochirale Ketoamid-Kopfgruppe 1248 markierte Liganden ergaben, die als Eingangsstruktur für das *Docking* verwendet wurden. Während der Einführung der Seitenkette an den Liganden wurde dabei wieder automatisch das Pharmakophor-Modell von Thr1 erstellt (d = 0.4 Å). Um das *Docking* auf die Substratbindetasche zu beschränken wird zusätzlich ein aromatisches Pharmakophor an Position des Phenylketoamids sowie die Donor- und ein Akzeptor-Eigenschaft der Amid-Bindung zwischen P2 und P3 des Liganden eingeführt (d = 2.0 Å; Abbildung 72). Dann wurden für jede der 1248 Startkonformationen bis zu 5000 Konformere durch Drehung von Bindungen für die Pharmakophor-Platzierungsmethode erzeugt, in der Summe also ca. 6 Millionen Konformationen, die durch das definierte Pharmakophormodell vor der Energie-minimierung des *Docking*-Schritts gefiltert wurden.

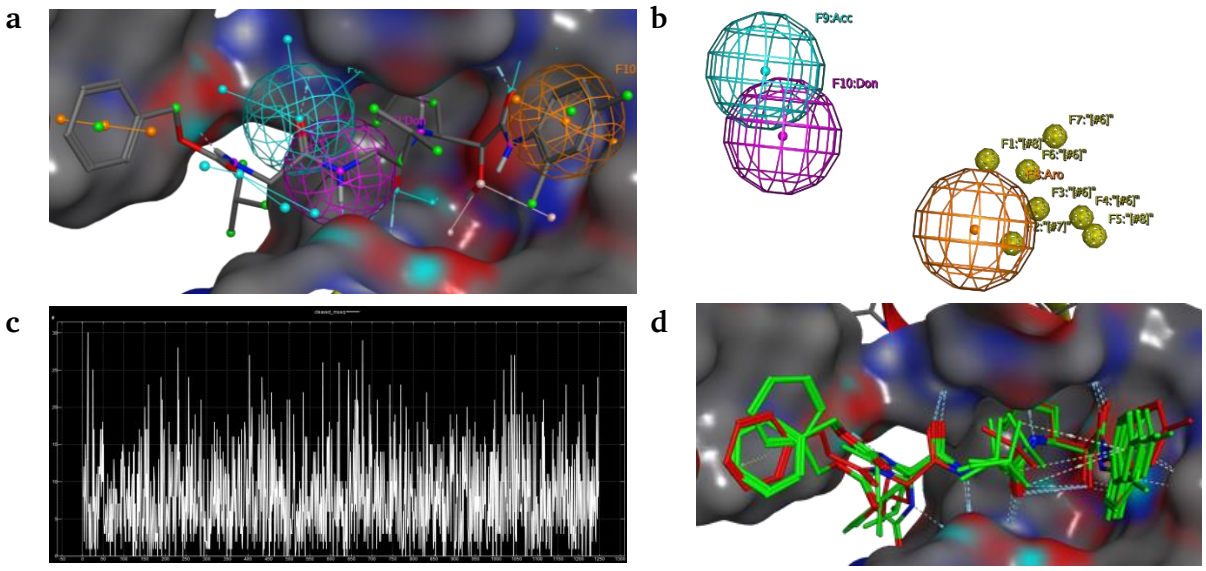


Abbildung 72. (a) Pharmakophor-Eigenschaften von **BSc4999** (R = 2.0 Å, PDB: 4R02) und (b) dem Nukleophil Thr1 (gelb, R = 0.4 Å). (c) Verteilung der *Docking*-Positionen (y-Achse, 0 bis 30) in Abhängigkeit von der Startkonformation (X-Achse, 0 bis 1248). (d) Überlagerung der nativen Konformation von **BSc4999** (rot) und der modellierten Bindungskonformationen (grün, RMSD < 2.0 Å).

Von allen Konformationen, die in das Pharmakophormodell passen, wurden dann nur die 100 am höchsten bewerteten Positionen für die weitere Energieminimierung verwendet. Nach dem *Docking* wurden so 9625 Konformationen erhalten, die vom Nukleophil getrennt wurden und mit der Wissens-basierten DSX-Methode bewertet wurden. In den Top-1% der DSX-bewerteten Positionen (96) resultieren 7 Positionen mit einem RMSD von weniger als 2 Å, verglichen mit der nativen Struktur. Interessanterweise variiert die Anzahl der Konformationen, die im *Docking* erzeugt wurden, stark abhängig von der verwendeten Startkonformation, was zeigt, dass die verwendete *Docking*-Strategie eine höhere Erfolgswahrscheinlichkeit für prädiktives *Redocking* erlaubt. So wurden je nach Startkonformation zwischen 0 und 30 Hits durch das *Docking* erhalten, im Mittel 7.7 pro Startkonformation (Abbildung 73). Diese Methode wurde anschließend für das *de novo Docking* der Leitstruktur **BSc5376** in die β5-Untereinheit verwendet. Hierfür wurde das Pharmakophormodell von **BSc4999** verwendet. Es wird wiederum eine stochastische Stichprobe möglicher, lokal energieminimierter Konformationen verwendet, die 343 freie Konformationen von **BSc5376** ergaben. Nach Markierung und Verknüpfung mit der Thr1 Seitenkette wurden 686 Startkonformationen für das kovalente *Docking* erhalten. Das kovalente *Docking* ergab unter den gleichen Parametern wie für **BSc4999** ca. 32.000 Positionen von **BSc5376** in der β5-Untereinheit, die dann wiederum von der Seitenkette getrennt wurden und mit der DSX-Methode neu bewertet wurden. Die dabei am besten bewertete Position zeigt dabei im konservierten Molekülteil eine ähnliche Konformation wie **BSc4999**, wobei die Variation in P4 und P1‘ jedoch zu wichtigen Unterschieden führte. So ist die Phenylether-Gruppe, im Gegensatz zur ursprünglichen Modellierung vollständig in der P1‘ Tasche platziert, während die bereits bekannte Phenylamid-Gruppe noch im Bindungskanal liegt, ähnlich zur nativen Struktur von **BSc4999**. Der Austausch der Cbz-Gruppe in P4 hat in diesem *Docking*-Modell entgegen der ursprünglichen Annahme nicht zu Interaktionen mit der β6-Unterinheit in P4 geführt, sondern resultierte nach dem *Docking*-Modell in einer Drehung um die Amid-Bindung und Belegung der S3-Tasche von β5, wodurch die Leucin-Seitenkette in Richtung von S4 gedreht wird. Um diesen Mechanismus weiter zu verstehen wurde nicht nur die am höchsten bewertete Position, sondern die Top-1% der Positionen (320 Poses, DSX < 200) analysiert. Für diese wurden die RMSD-Abweichungen zur höchst-bewerteten Position berechnet (0 bis 12 Å, Abbildung 73d).

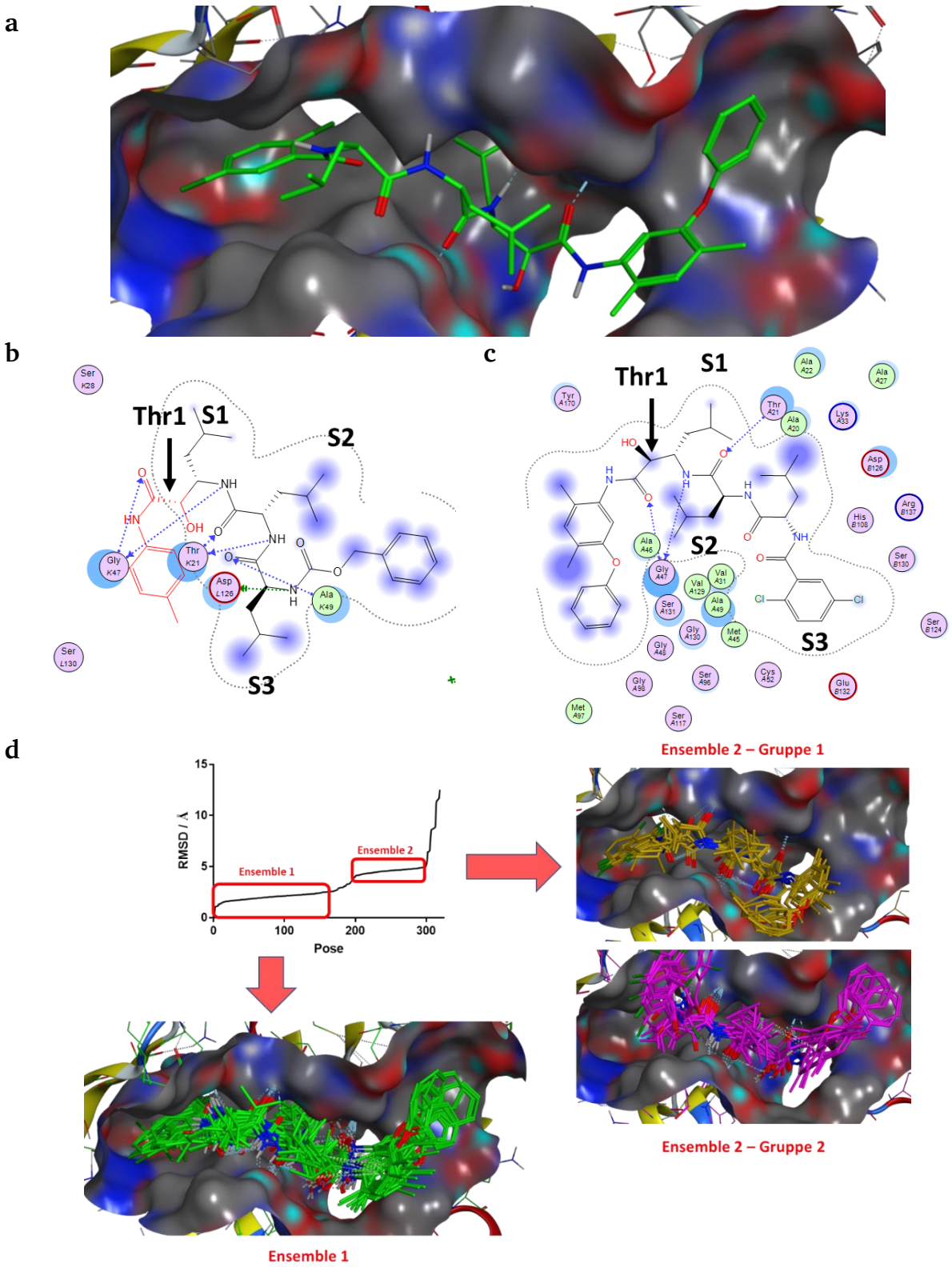


Abbildung 73. (a) Bindungskonformation der am besten bewerteten *Docking*-Struktur von **BSc5376** in die β5-Untereinheit. (b) Übersicht der Liganden-Interaktionen von **BSc4999** und (c) **BSc5376**. (d) Verteilung der *Docking*-Positionen nach ihrem mittleren Abstand (RMSD) zur best-bewerteten *Docking*-Konformation von **BSc5376**.

Hierbei konnten zwei Cluster beobachtet werden, die eine ähnliche mittlere Abweichung zur Position in Abbildung 73a zeigten. Im Ensemble 1 können 158 Positionen von **BSc5376** zusammengefasst werden, die einen RMSD-Wert von weniger als 2.5 Å zeigen (Abbildung 73d). In dieser Gruppe liegt, wie in der bestbewerteten Position, die 2,5-Dichlorbenzamid-Gruppe in S3 und die Phenylether-Gruppe in S1‘. Variationen im RMSD-Wert kommen hierbei hauptsächlich durch Variation der exakten Position der drei Leucin-Seitenketten zustande.

Hierbei sind jedoch zwei Konformationen der Amid-Bindung zwischen P3 und P4 möglich (Abbildung 74a). Die Platzierung der im Vergleich zu Leucin deutlich größeren Phenylgruppe kann sowohl entropisch als auch enthalpisch vorteilhaft sein. In der Kokristallstruktur von **BSc4999** wird deutlich, dass die S3-Tasche von der Leucin-Seitenkette nur unvollständig ausgefüllt wird, wodurch sich drei Wassermoleküle in der Tasche befinden, die durch die Phenylgruppe verdrängt werden, was einen entropischen Vorteil der Bindung zur Folge hat (Abbildung 74a). Zudem kann durch unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen ein enthalpischer Vorteil der Bindung entstehen, der mit der kleineren Leucin-Seitenkette nicht möglich ist. Die Orientierung des Dimethylphenyl-Rings ist ähnlich wie in **BSc4999** und erlaubt die Zugänglichkeit von S1‘ durch die 3-substituierte Phenylether-Gruppe unabhängig von der Konformation in P3 und P4 (Abbildung 73d). Durch Überlagerung der Kokristallstruktur des yCP mit der Dibenzyl-geschützten Variante des in der Einleitung erwähnten Naturstoff **Homobelactosin C** wird die Plausibilität dieser Konformation weiter ersichtlich (Abbildung 74c). Hier erfolgt die Belegung der S1‘-Tasche ebenfalls durch einen Phenyl-Ring. Im Ensemble 2 (Positionen 201-297, RMSD = 4.14 bis 4.95 Å) können zwei Untergruppen mit unterschiedlichen *Docking*-Positionen unterschieden werden, wobei die Belegung von S1 und S2 durch die Leucin-Seitenketten vergleichbar ist. In Gruppe 1 (51 von 97 Poses) erfolgt eine 180°-Drehung um die C-N-Bindung des Phenylamids wodurch die Phenylether-Gruppe in die S1‘ gegenüberliegende Seite gedreht wird. Hierbei erfolgt die Belegung von S3 durch die 2,5-Dichlorbenzamid-Gruppe analog zu Ensemble 1. Während in Gruppe 2 (46 von 97 Poses) die Phenylether-Gruppe wie in Ensemble 1 vorliegt, ist die Leucin-Seitenkette von P3 wieder in S3 platziert und die 2,5-Dichlorbenzamid-Gruppe nimmt einen Bindungsmodus analog zu der ursprünglichen Cbz-Schutzgruppe ein. Ensemble 1 stellt mit 158 Positionen ca. 3-mal so viele Positionen dar wie jede Untergruppe in Ensemble 2, weshalb, auch durch

Übereinstimmung mit der Struktur von **Homobelactosin C**, dieser Bindungsmodus als Startpunkt für die weitere Inhibitor-Optimierung dienen sollte.

Die bevorzugte Addition von Thr1 in der *R*-Konfiguration, die in der Kokristall-Struktur beobachtet wird, resultiert auch im *Docking* bevorzugt. Im Ensemble 1 ist die *R*-Konfiguration deutlich bevorzugt (77%), wobei die Häufigkeit in den verbleibenden Positionen deutlich geringer ist (62%). Wichtig ist außerdem, dass die Besetzung des Oxyanionen-Lochs im aktiven Zentrum in diesen Modellen korrekt wiedergegeben wird. Dieses ist nach Addition von Peptidaldehyden durch die Halbacetal-Hydroxylgruppe belegt, während nach Addition von Thr1 an das Ketoamid die Hydroxylgruppe von diesem weg zeigt und stattdessen die Carbonylgruppe des Phenylamids in dieser Position zu finden ist. Wichtig ist außerdem, dass es keine Korrelation der *Docking*-Position (sowohl DSX als auch London dG) zum RMSD-Wert der nativen beziehungsweise bestbewerteten Konformation gibt. Somit ist der Konformations-*Clustering* Ansatz, der in diesem Kapitel gewählt wurde, deutlich aussagekräftiger.

Entscheidend für die Interpretation von *Docking*-Ergebnissen ist folglich nicht nur das reine *Scoring* von *Docking*-Positionen, sondern auch eine kritische Betrachtung der Gesamtheit der *Docking*-Experimente.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Ensemble 1 den wahrscheinlichsten Bindungsmodus von **BSc5376** darstellt. Ein endgültiger Beweis kann aber nur durch experimentelle Methoden wie beispielsweise Kokristallisation mit dem yCP oder cCP erfolgen.

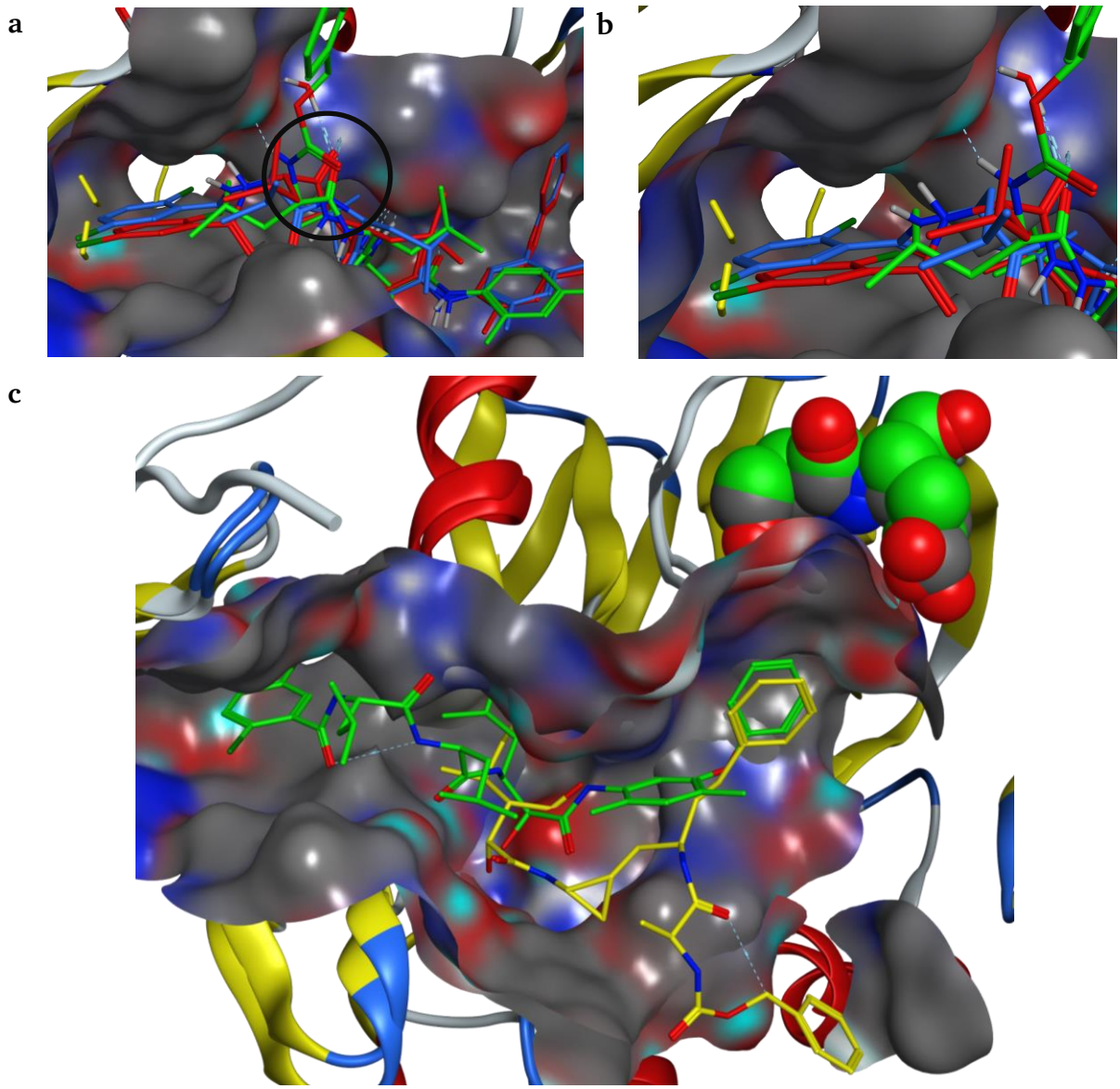


Abbildung 74. (a) Überlagerung von **BSc4999** (grün) und der modellierten Bindungskonformation von **BSc5376** auf Rang 1 (blau) und Rang 4 (rot). Bei der Position auf Rang 4 weist das Amid zwischen P2 und P3 den gleichen Bindungsmodus auf wie **BSc4999** (schwarzer Kreis). (b) Nahaufnahme der S3-Tasche des yCP und Position der drei Wassermoleküle in S3, die durch einen großen Rest wie in **BSc5376** verdrängt werden können. (c) Überlagerung des modellierten Bindungsmodells von **BSc5376** (grün) und der **Homobelactosin C** Kristallstruktur im yCP (gelb, PDB: 4J70; Ser117, Asp118 in yCP und cCP).

3.2.6 Entwicklung eines *Danio rerio* Embryo Fluchtreflex-Assays

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt die periphere Neuropathie die schwerste, Dosis-limitierende Nebenwirkungen des klinisch verwendeten Proteasom-Inhibitors **Bortezomib**, aber auch anderer, nicht auf das Proteasom abzielende Chemotherapeutika, dar. Deshalb ist ein effizient durchführbares, präklinisches Assay wünschenswert, um die neurotoxische Wirkung einschätzen zu können. Im Rahmen dieser Dissertation sollte ein Fluchtreflex-Assay an Embryonen des Zebrafisch (Wildtyp, *Danio rerio*) im Arbeitskreis etabliert werden. Ähnliche Testungen sind bereits vereinzelt durch andere Forschungsgruppen beschrieben worden, etwa zur Charakterisierung von **Bortezomib**, **Vincristin**, und **Acrylamid**, wobei sich der grundlegende Assay-Aufbau und die Durchführung an den bereits beschriebenen Arbeiten orientierte.[229-230]

Zur Bestimmung der phänotypischen Änderung des Fluchtreflexes wurden die Zebrafisch-Embryonen 24 hpf manuell dechorioniert und mit zwei verschiedenen Konzentrationen (25 μM, 50 μM) von **Bortezomib** und der Proteasom-Leitstruktur **BSc5376** mit unterschiedlicher Dauer (24 h, 48 h, 72 h) inkubiert. Die Fluchtreflexe der nach Behandlung noch lebenden Embryonen werden 96 dpf aufgenommen. Dazu werden die Zebrafischembryonen auf einen Objektträger unter einer *Highspeed*-Kamera platziert. Der detaillierte Versuchsaufbau ist in Kapitel 5.3.7.1 erläutert. Dabei wird der Fluchtreflex durch leichtes Berühren mit einer Nadel ausgelöst, wodurch gleichzeitig auch eine Einschätzung der sensorischen Kapazität des Embryos möglich wird. Die genaue Durchführung des Experiments ist in Kapitel 5.3.1.8 beschrieben. Die Auswertung der Bewegung des Zebrafisch-Embryos wurde mit einem MatLab-basierten Skript durchgeführt, das von Prof. Stefan Roth (FB Informatik, TU Darmstadt) bereitgestellt wurde (siehe Kapitel 5.3.7.2).

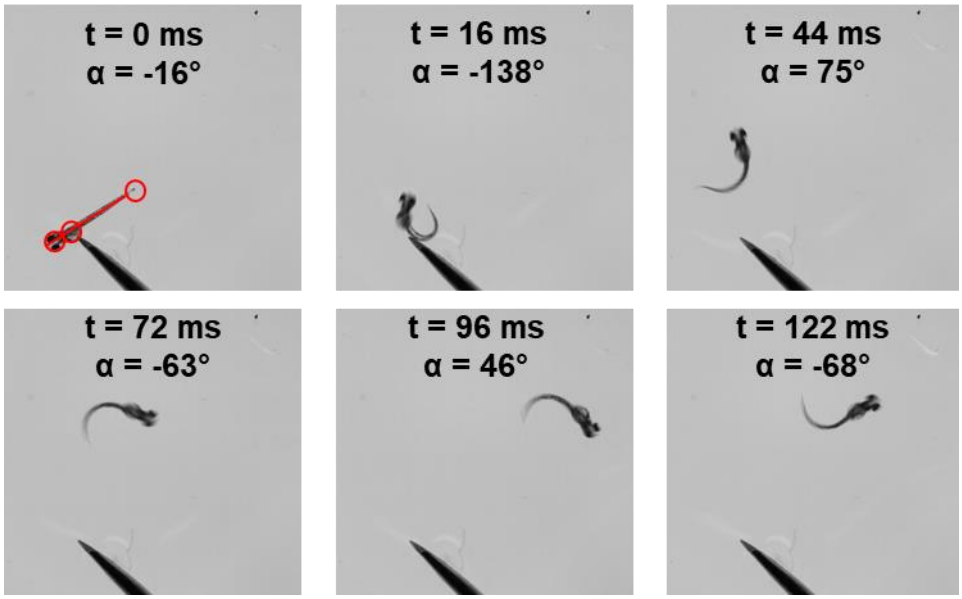


Abbildung 75. Typischer Bewegungsablauf des Fluchtreflexes eines Zebrafisch-Embryonen und beispielhafte Bestimmungen der Körperwinkel-Amplituden.

Die Toxizität von **Bortezomib** war bei 50 μM und 48 h bzw. 72 h Inkubationszeit hoch (0% Überlebensrate, n = 4, siehe Kapitel 5.3.8), während die Überlebensrate nach Behandlung mit **BSc5376** größer war (25% bis 75%, n = 4). Die Gesamt-Überlebensrate war für **Bortezomib** bei niedrigeren Dosen höher (92%), während sie für **BSc5376** bei 58% lag. Im Allgemeinen ist die Toxizität der noch im Chorion-befindlichen Embryonen höher (80% bis 90%, Kapitel 5.3.7), wobei diese Gruppe nicht für die Untersuchung des Fluchtreflexes herangezogen wurde. Alle Embryonen der Kontrollgruppe, sowohl dechorioniert als auch im Chorion befindlich, haben zum Ende des Experiments noch gelebt. Alle im Experiment verwendet Embryonen wurden spätesten 120 hpf euthanasiert, der Zeitpunkt zu dem die Embryonen noch nicht selbstständig auf Nahrungssuche gehen und somit noch nicht als Tiere eingestuft werden. Deshalb sind diese Versuche rechtlich nicht als Tierversuche einzuschätzen und somit nicht genehmigungspflichtig.

Da die Effekte auf den Fluchtreflex zwischen der Kontrolle und sowohl **Bortezomib** als auch **BSc5376** untersucht werden sollten, wurde die kinematische Analyse nur für die Behandlungsgruppen durchgeführt, bei der mindestens zwei Embryonen überlebt haben. Der charakteristische Fluchtreflex in einem Embryo aus der Kontrollgruppe und nicht-beeinflussten, behandelten Fischen beginnt mit einer starken Körperbeugung (*C*-

Bend), die vom Ort des Stimuli weg zeigt, gefolgt von einer starken Gegenbeugung zur Reorientierung des Embryos und anschließend der Fluchtbewegung selbst.

In Embryonen der Kontrollgruppe liegt die mittlere Amplitude der *C-Bend* bei 129 ± 13,3° (3 Embryonen, 3 Replikate je Embryo) und die mittlere Dauer der *C-Bend* bei 19.7 ± 1.4 ms (Tabelle 12). Während die mittlere *C-Bend*-Amplitude (131.6 ± 21.3°) und Dauer (32.7 ± 6.5 ms) in 24 h / 25 μM **Bortezomib**-behandelten Embryonen unverändert ist ($p > 0.05$), kann eine starke Abnahme der Amplitude in 48 h / 25 μM **Bortezomib**-behandelten Embryonen (6.9 ± 5.6°, $p < 0.0001$) beobachtet werden. Hierbei ist die mittlere Dauer der *C-Bend* statistisch nicht signifikant verändert, aber variiert deutlich stärker (95% CI = -26 bis +3 ms im Vergleich zur Kontrolle). Interessanterweise zeigen die mit der höchsten Konzentration, 24 h / 50 μM, **Bortezomib**-behandelte Embryonen keine Reaktion auf den Berührungsstimulus (50 Stimuli je Embryo, insgesamt 150 Stimuli, keine Reaktion). Deshalb konnte kein Fluchtreflex beobachtet werden, die Körper-Beugungsamplitude wird auf „0“ gesetzt und damit eine nicht-vorhandene Bewegung charakterisiert ($p < 0.0001$, $n = 3$ Embryonen). Entsprechend sind die *C-Bend* Amplitude (0±0°, $p < 0.0001$) und die Dauer der *C-Bend* (0±0 ms, $p < 0.0001$) nicht vorhanden und stellen damit einen drastischen Unterschied zur Kontrolle dar.

Tabelle 12. Analyse kinematischer Parameter des Fluchtreflexes von behandelten und Kontroll-Embryonen. Gelb: Kinematische Parameter der Kontrollgruppe. Grün: Statistisch signifikante Unterschiede im kinematischen Parameter der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Grau: Kein statistisch signifikanter Effekt beobachtbar. * = $p < 0.05$. ** = $p < 0.01$. *** = $p < 0.001$. **** = $p < 0.0001$. n.s. = $p > 0.05$. Die detaillierte statistische Auswertung befindet sich im experimentellen Teil in Kapitel 5.3.7.3.

Parameter	Kontrolle	Bortezomib			BSc5376		
		24 h		48 h	24 h		48 h
		25 µM	50 µM	25 µM	25 µM	50 µM	25 µM
***C-Bend* Amplitude**	129 ± 13,3	131,6 ± 21,3	0 ± 0 ****	6,9 ± 5,6 ****	126,2 ± 14,1	121,7 ± 7,4	119,8 ± 6,8
***C-Bend* Dauer**	19,7 ± 1,4	32,7 ± 6,5	0 ± 0 ****	8,2 ± 6,7	14 ± 0,8 **	19,2 ± 2,2	15,6 ± 0,5 *
Reflex-Dauer	390,7 ± 50,7	540,2 ± 136,6	0 ± 0 ****	289,3 ± 198,9	295,3 ± 28,5	799 ± 91,8 **	403,6 ± 30,9
Anzahl an Bewegungen	14,1 ± 2,8	11,6 ± 3,3	0 ± 0 ****	3,2 ± 2,3 **	11,5 ± 1	30,67 ± 3,3 **	16 ± 1,4
Anzahl an Bewegungen pro 100 ms	3,5 ± 0,32	1,92 ± 0,35 **	0 ± 0 ****	0,24 ± 0,32 ****	3,9 ± 0,25	3,9 ± 0,22	4,0 ± 0,26

Im Gegensatz dazu zeigen Embryonen, die mit **BSc5376** behandelt wurden, ähnliche Fluchtreflexe wie die Kontrolle (Abbildung 76). Dennoch konnte ein leichter Anstieg in der Dauer der *C-Bend* 25 μM / 24 h **BSc5376**-behandelten Embryonen (14 ± 0.8 ms, $p < 0.01$) und der für 25 μM / 48 h **BSc5376**-behandelten Embryonen (15.6 ± 0.5 ms, $p < 0.05$) beobachtet werden.

Ein großer Unterschied konnte auch anhand der Reaktion auf den Berührungsstimulus in Vergleich zwischen der Kontrolle, **BSc5376**- und **Bortezomib**-behandelten Embryonen festgestellt werden und kann ein Hinweis auf eine sensorische Neuropathie darstellen. In der Kontrollgruppe beträgt die mittlere Rate der Reflexe je Stimuli 47%. In der Bortezomib-Behandlungsgruppe konnte eine starke Abnahme der Reaktionsrate festgestellt werden (8% für 24 h, 2% für 48 h Inkubationszeit; 25 μM **Bortezomib**), während nach Behandlung mit **BSc5376** überraschenderweise eine erhöhte Sensitivität festgestellt werden kann (100% für 24 h mit 25 μM und 50 μM behandelten Embryonen). In der Gruppe der 25 μM / 48 h **BSc5376**-behandelten Embryonen zeigte sich eine zur Kontrollgruppe vergleichbare Sensitivität (55%).

Zusätzlich zur *C-Bend* und der Stimulus-Reaktion ist auch die Gesamtdauer des Fluchtreflexes, die Anzahl der Bewegungsabläufe, und schlussendlich, die auf die Zeit (100 ms) bezogene Anzahl der Bewegungen ein entscheidender kinematischer Faktor. Dieser Parameter zeigte große, statistisch signifikante Verringerung der Bewegungsraten in allen **Bortezomib**-behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle (3.5 ± 0.32 pro 100 ms). Diese ist ungefähr halb so groß für 25 μM / 24 h **Bortezomib**-behandelten Embryonen (1.92±0.35, $p < 0.01$) und fast vollständig absent für 25 μM / 24 h-behandelte Embryonen (0.24±0.32, $p < 0.0001$) und vollständig für die nicht-reagierenden 50 μM / 24 h **Bortezomib**-behandelten Embryonen (0±0, $p < 0.0001$). In starkem Gegensatz hierzu ist die mittlere Anzahl der Bewegungen pro 100 ms für **BSc5376**-behandelte Embryonen nicht statistisch signifikant geändert für 25 μM nach 24 h (3.9±0.25, $p > 0.05$) und 48 h (4.0 ± 0.26, $p > 0.05$) Inkubationszeit. Interessanterweise zeigen Embryonen, die für 24 h mit 50 μM **BSc5376** behandelt wurden eine erhöhte Reflexdauer (799 ± 0.92 ms, $p < 0.01$) und eine erhöhte Anzahl an Bewegungen (30.7 ± 3.3, $p < 0.01$) aber eine vergleichbare Bewegungsrate wie die Kontrollgruppe (3.9 ± 0.22 pro 100 ms, $p > 0.05$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Leitstruktur **BSc5376** wahrscheinlich keine relevante *off target*-Inhibition aufweist und es zu keinen Beeinträchtigungen der sensorischen Reaktion und des Fluchtreflexes von

Zebrafisch-Embryonen, im Gegensatz zu **Bortezomib**, kommt. Nachdem dieses Assay in seinem Aufbau und der kinematischen und statistischen Analyse in der Arbeitsgruppe etabliert ist, sollte dieses standardmäßig in der Charakterisierung neuer Leitstrukturen getestet werden. Dabei sind insbesondere mit **Bortezomib**-verwandte Inhibitoren, wie etwa **Ixazomib** (sowohl das *Prodrug* als auch der aktive Metabolit) und verschiedene Chemotherapeutika, aber auch Naturprodukte und Kinase-Inhibitoren interessant. Fluchtreflexe können als zusätzlicher Parameter für die präklinische Sicherheitsbeurteilung von Wirkstoffen dienen und somit eine effektivere, erfolgreichere und insgesamt Kosten-günstigere Wirkstoffentwicklung etablieren.

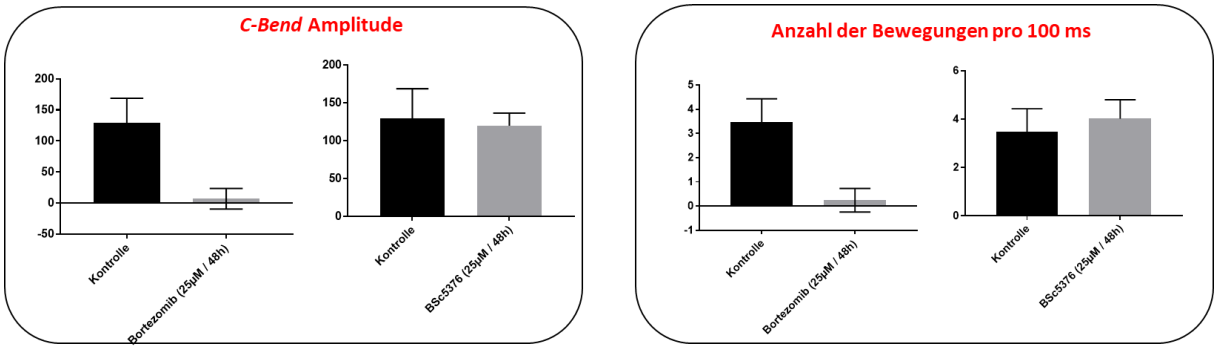


Abbildung 76. Vergleich der *C-Bend*-Amplitude (in °) und Anzahl der Bewegungen pro 100 ms in Bortezomib- oder BSc5376-behandelten Embryonen.

3.3 Modellierung neuer, kovalent bindender FLT3- und Proteasom-Inhibitoren

Im folgenden Kapitel sollen, basierend auf den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit, neue, kovalent bindende Leitstrukturen zur Inhibition der Kinase FLT3 und des Proteasoms modelliert werden, um so neue Startpunkte für aktivere und selektivere Inhibitoren zu generieren.

3.3.1 Entwicklung einer Strategie zur kovalenten Modellierung von makrocyclischen Imidazo[1,2-a]pyridinen zur Inhibition von FLT3

Die in Kapitel 3.1 entwickelten Vinylsulfonamid- und 2-Chloracetamid-Leitstrukturen zeigen das Potential, durch die Verknüpfung von reversiblen Inhibitoren mit elektrophilen Gruppen ökonomisch effizient hoch potente Inhibitoren darzustellen. Ein Problem dieser Verbindungen ist jedoch die geringe Halbwertszeit gegenüber Glutathion und die nicht-optimale Selektivität gegenüber nicht-Zielkinasen, die unvorteilhaft für eine klinische Entwicklung sein kann. Das in Kapitel 3.1 vorgestellte, reversibel-bindende Imidazo[1,2-a]pyridin-Fragment **BSc5221** (Abbildung 77) zeigt eine gute Inhibition von FLT3wt und lässt als monodentater Ligand, der nur eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit Cys694 in der *Hinge*-Region eingeht, eine gesteigerte Selektivität erwarten. Die zelluläre Aktivität war jedoch gering, weshalb die Struktur vergrößert werden sollte. Frett et al. haben im Jahr 2015 eine Thiophen-substituierte Imidazo[1,2-a]pyridin-Leitstruktur vorgestellt.[231] In der Arbeitsgruppe konnte im Rahmen der Masterarbeit von Marie Quillmann das analoge, Phenyl-substituierte Derivat **BSc5228** dargestellt werden.

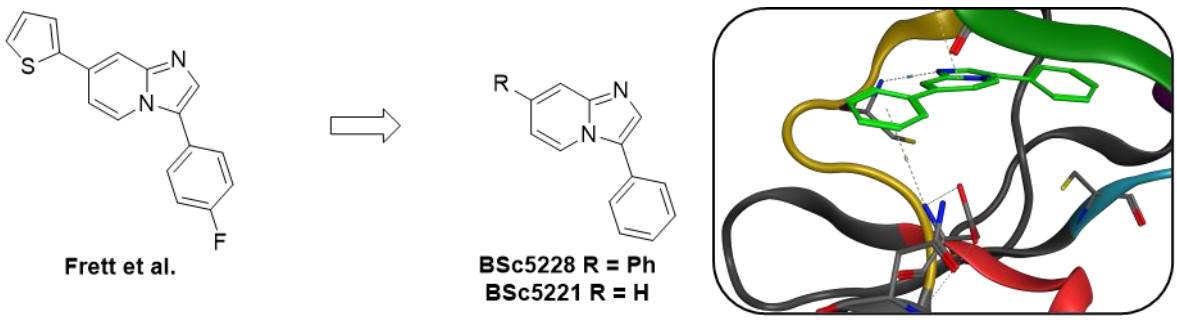


Abbildung 77. Struktur der Imidazo[1,2-a]pyridin-basierten Inhibitoren **BSc5221**, **BSc5228** und das von Frett et al. beschriebene, Thiophen-substituierte Imidazo[1,2-a]pyridin. Die klassische, reversible Modellierung zeigt einen monodentaten Bindungsmodus von **BSc5228** (grün).

Dieses zeigt eine deutlich höhere zytotoxische Aktivität in MV4-11-Zellen (IC_{50} = 476 nM) als **BSc5221**, weshalb es in diesem Unterkapitel als Startmolekül für die Modellierung neuer, kovalent bindender Leitstrukturen zur Inhibition von FLT3 verwendet wird. Das Fragment **BSc5228** zeigt im konventionellen, reversiblen *Docking* einen monodentaten Bindungsmodus in der ATP-Bindungstasche, der ähnlich zu dem von **BSc5221** ist, wobei die 4-Phenyl-Gruppe in die Solvens-Seite der Kinase exponiert ist. Wie bereits am Beispiel von **Sunitinib** und den in dieser Arbeit entwickelten Indolinon-Derivaten gezeigt wurde, bieten sich kombinierte Wasserstoffbrücken-Bindungen mit Asn701 und Asp698 am Ende der *Hinge*-Region an, um die Aktivität und Selektivität gegenüber der Zielkinase zu steigern (Abbildung 78). Durch Verknüpfung mit elektrophilen Gruppen kann wiederum eine kovalente Inaktivierung von FLT3 erfolgen. Um die Cystein-Reaktivität zu verringern und eine höhere konformative Flexibilität zu erlauben, sollte jedoch an einer benzylischen Position der Michael-Akzeptor eingeführt werden. Hierbei erscheint die *meta*-Substitution besonders vorteilhaft, da hier eine Donor-Akzeptor-Wechselwirkung des Sauerstoffs mit Lys644 möglich ist, was auch schon in der Modellierung von **BSc5371** beobachtet wurde. In Abbildung 78 ist eine mögliche Derivatisierung mit den entsprechenden Ergebnissen des kovalenten (Verbindungen **25** und **26**) und reversiblen *Docking* (Verbindungen **27** und **28**) dargestellt.

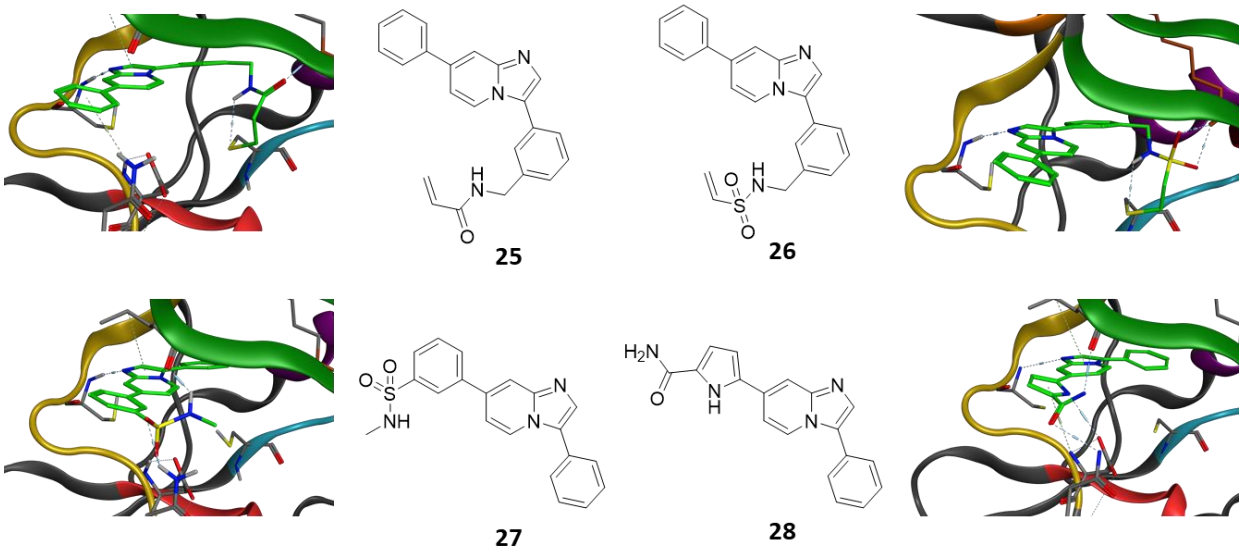


Abbildung 78. Mögliche Derivatisierung und Bindungsmodus von elektrophilen Gruppen am 3-Phenyl-Ring oder mit unterschiedlichen Donor-Akzeptor-Substituenten am 7-Phenyl-Ring.

Sowohl das benzylische Vinylsulfonamid- und als auch das Acrylamid-Elektrophil sind sterisch in der Lage, Cys828 zu erreichen. Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen mit Asn701 oder Asp698 können am einfachsten durch Substitution an der benachbarten 3-Position des 7-Phenyl-Rings erzeugt werden. Hierbei bieten sich beispielsweise Amid-, Sulfonamid- (Verbindung **27**), Keton-, oder Hydroxylsubstituenten an, die ein Akzeptor- oder ein kombiniertes Donor- und Akzeptor-Motiv beinhalten. Es sind aber auch direkte heterozyklische Substitutionen anstelle des Phenyl-Rings denkbar, die ein Donor- oder Akzeptor-Motiv im Ring enthalten, wie der Pyrrol-Ring in Verbindung **28**. Zusätzlich kann diese noch durch Donor-Akzeptor-Motive ergänzt werden. Die Kombination der Ergebnisse aus der reversiblen und irreversiblen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erlauben dann eine effiziente Hybridisierung unterschiedlicher Treffer, wobei Hybridstrukturen wie Verbindung **29** entstehen (Abbildung 79). Interessanterweise wurden Derivate der Imidazo[1,2-a]pyridine bereits als Fluorophore beschrieben. Somit sollte in zukünftigen Experimenten auch geprüft werden, ob durch die intrinsische Fluoreszenz dieser Inhibitoren eine BODIPY-freie, kovalente Markierung zur beispielsweise diagnostischen oder biochemischen Anwendung ermöglicht wird.

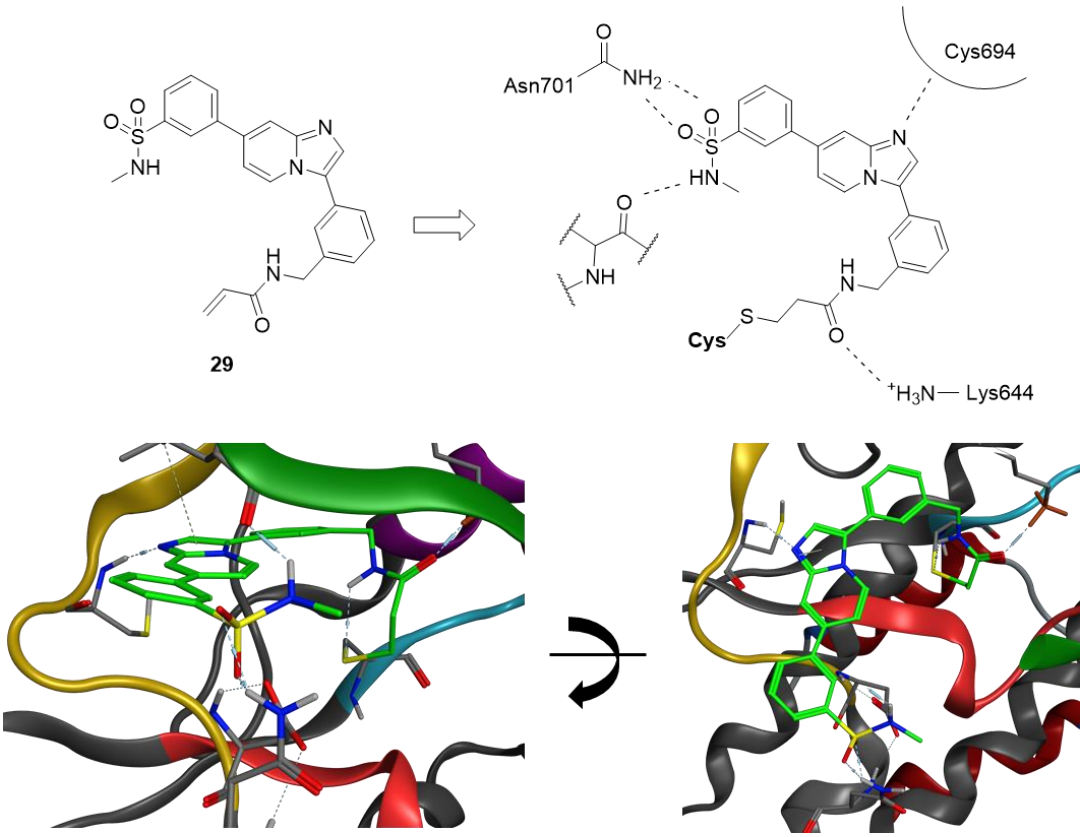


Abbildung 79. Bindungsmodus einer möglichen Hybridisierung der Struktur-Aktivitätsbeziehungen aus den Strukturen **25** und **27** unter Bildung der Zielstruktur **29**.

3.3.2 Entwicklung einer virtuellen *Screening*-Strategie zur Entdeckung dual-kovalent bindender Proteasom-Inhibitoren

Das Immunoproteasom spielt eine zentrale Rolle für die Pathogenese verschiedener entzündlicher und neoproliferativer Erkrankungen und kann möglicherweise Resistenzen gegenüber Inhibitoren des konstitutiven Proteasoms erzeugen (siehe Kapitel 3.2). Bis heute ist noch kein selektiver Inhibitor zugelassen, welcher ausschließlich das Immunoproteasom inhibiert. Groll et al. haben im Jahr 2015 erstmals einen selektiven Inhibitor des Immunoproteasoms vorgestellt (Verbindung **30**), der ein nicht-konserviertes Cystein (Cys48) in der S4-Tasche der β5i-Untereinheit alkyliert (Abbildung 80). Damit konnte eine Inhibition des Proteasoms im Lysat der iCP-exprimierenden THP-1-Zelllinie gezeigt werden, jedoch keine Inhibition der Zellviabilität erreicht werden. Somit ist davon auszugehen, dass die reversible Verweilzeit des Inhibitors in β5i recht gering ist und damit die zelluläre Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Im Jahr 2018 wurde von Klein et al. eine Reihe dual-kovalenter Inhibitoren in einem Patent publiziert, unter anderem Derivate der Verbindung **31**.[232]

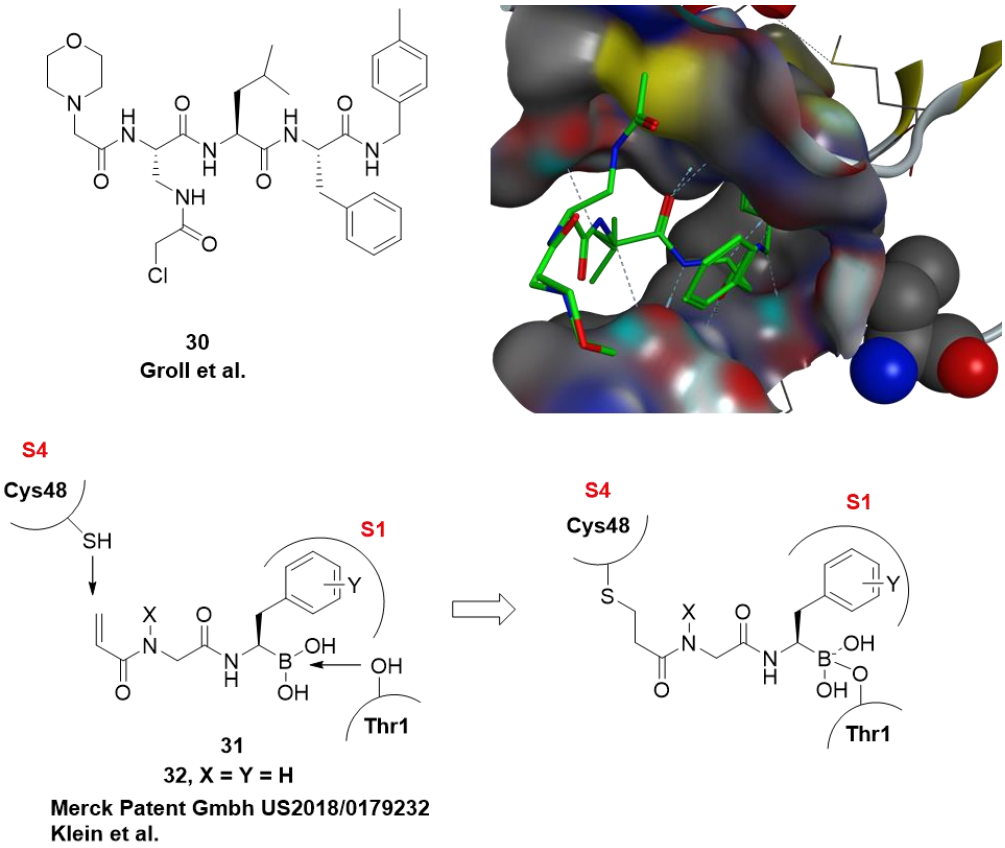


Abbildung 80. Ansätze zur selektiven Inhibition des Immunoproteasoms durch kovalente Modifikation von Cys48.

Diese haben deutlich kleinere Molekülmassen als die üblicherweise verwendeten Tri- und Tetrapeptide und sind Peptidanaloga, weshalb eine orale Anwendung möglich wird. Der Vorteil dieser dual-kovalenten Inhibitionsstrategie ist, neben der hohen Selektivität, dass sich zuerst ein kovalenter, reversibler Komplex des Boronats mit Thr1O$^{\gamma}$ bildet, wodurch eine längere Residenzzeit im Zielenzym ermöglicht werden kann. Anschließend kann die Cystein-reaktive Gruppe einen irreversiblen Komplex mit Cys48 bilden. Es ist jedoch möglich, dass die verwendete Boronat-Kopfgruppe, ähnlich zu **Bortezomib** und **Ixazomib**, eine geringere Selektivität aufweist als andere Kopfgruppen und Nebenwirkungen auslöst. Für diesen pharmakologischen Ansatz sind jedoch keine strukturellen Informationen zum Bindungsmodus vorhanden, weshalb in diesem Kapitel eine dual-kovalente *Docking*-Strategie entwickelt wurde. Diese basiert auf der bisherigen *Docking*-Strategie und geht vom Amid **32**, dem einfachsten Fall, aus. Im ersten Schritt werden jedoch keine stochastischen Konformationen generiert, sondern es erfolgt ein klassisches reversibles *Docking* in Anlehnung an Kapitel 3.1 (Abbildung 81). Die Boronat-Gruppen der so erzeugten Konformationen werden wie beschrieben mit dem nukleophilen, katalytisch aktiven Thr1-Rest verknüpft, wobei das Acrylamid-Elektrophil nicht verändert wird. Hierbei kann über die Priorität des markierten Elektrophils die Reihenfolge des *Docking* variiert werden. Der mit Thr1 verknüpfte Inhibitor wird Pharmakophor-basiert in die β5-Untereinheit gedockt, wobei eine hydrophobe Pharmakophor-Eigenschaft in S1 gelegt wird, damit ein geringerer Rechenaufwand entsteht. Die so erhaltenen Konformationen werden nun am Acrylamid-Elektrophil markiert und mit dem Seitenketten-Schwefel-Atom von Cys48 verknüpft. Hierbei sollte jedoch nicht die komplette Aminosäure des zweiten Nukleophils verknüpft werden. Einerseits würden durch die Kombination der sieben Pharmakophor-Eigenschaften von Thr1 und den fünf Pharmakophoren von Cys48 eine zu hohe Anzahl an Pharmakophoren entstehen, die in der Platzierung kaum zu berücksichtigen sind, andererseits entsteht eine zu hohe Anzahl an frei drehbaren Bindungen. Zudem sind hierdurch Hauptketten-Interaktionen von Cys48 mit dem Inhibitor schlecht einschätzbar. Mit dieser Methode konnte sowohl für das Boronat-Derivat **32** (Abbildung 81) als auch das analoge *N*-Phenylamid-Derivat **33** und dem Ketoamid-basierten Derivat **34** Bindungshypothesen vorhergesagt werden (Abbildung 80). Die Boronate **32** und **33** gehen dabei ähnliche Interaktionen mit den Resten um Thr1 ein wie **Bortezomib**.

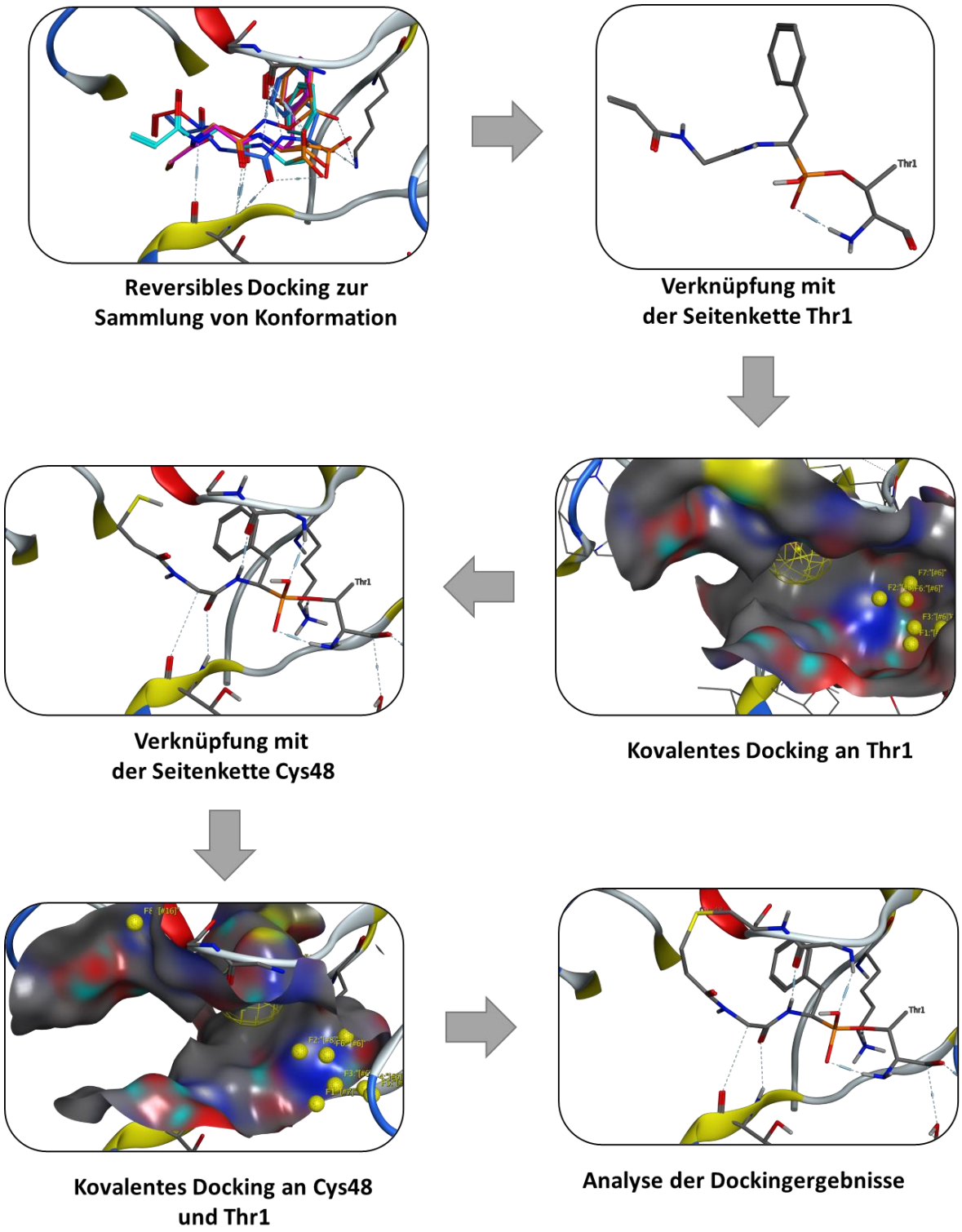


Abbildung 81. *Screening*-Strategie zur Entdeckung dual kovalent-bindender Inhibitoren des iCP.

Das Ketoamid **34** zeigt in der S1'-Tasche die gleichen Interaktionen wie **BSc5376**. Die S1-Tasche wird durch den größeren Phenylrest stärker ausgefüllt. Nach Bildung des Halbketals mit Thr1 liegt ebenfalls der gleiche Additionsmechanismus der elektrophilen

Kopfgruppe vor. Dabei liegt der Carbonyl-Sauerstoff der Amid-Gruppe im Oxyanionen-Loch und der Phenoxy-Rest in S1‘. Die Acrylamid-Gruppe liegt in P4. Eine *N*-Substitution der *N*-terminalen Amid-Bindung mit beispielsweise einem Methyl- oder Phenyl-Rest erlaubt in diesem *Docking*-Modell die Besetzung der S3-Tasche. Außerdem wird hiermit eine Orientierung des Peptid-Rückgrats in dem Bindekanal verhindert, wodurch eine Orientierung des Acrylamid-Elektrophils in die Selektivitätstasche erschwert würde. Zudem ist somit vermutlich eine höhere metabolische Stabilität erreichbar, da ein Zugang in die katalytische Tasche von Proteasen erschwert wird.

Es ist außerdem zu betonen, dass eine dual-kovalente Modellierungsstrategie bisher noch nicht beschrieben ist. Das Problem ist hierbei typischerweise, dass Modellierungsprogramme die Definition eines einzelnen Nukleophils und eines einzelnen Elektrophils fordern, was durch die sequentielle Anknüpfung und das reduzierte Pharmakophor umgangen wird. Außerdem können mit der hier vorgestellten Strategie diverse Elektrophile miteinander kombiniert werden, da die Platzierung Nukleophil- und nicht Elektrophil-basiert erfolgt.

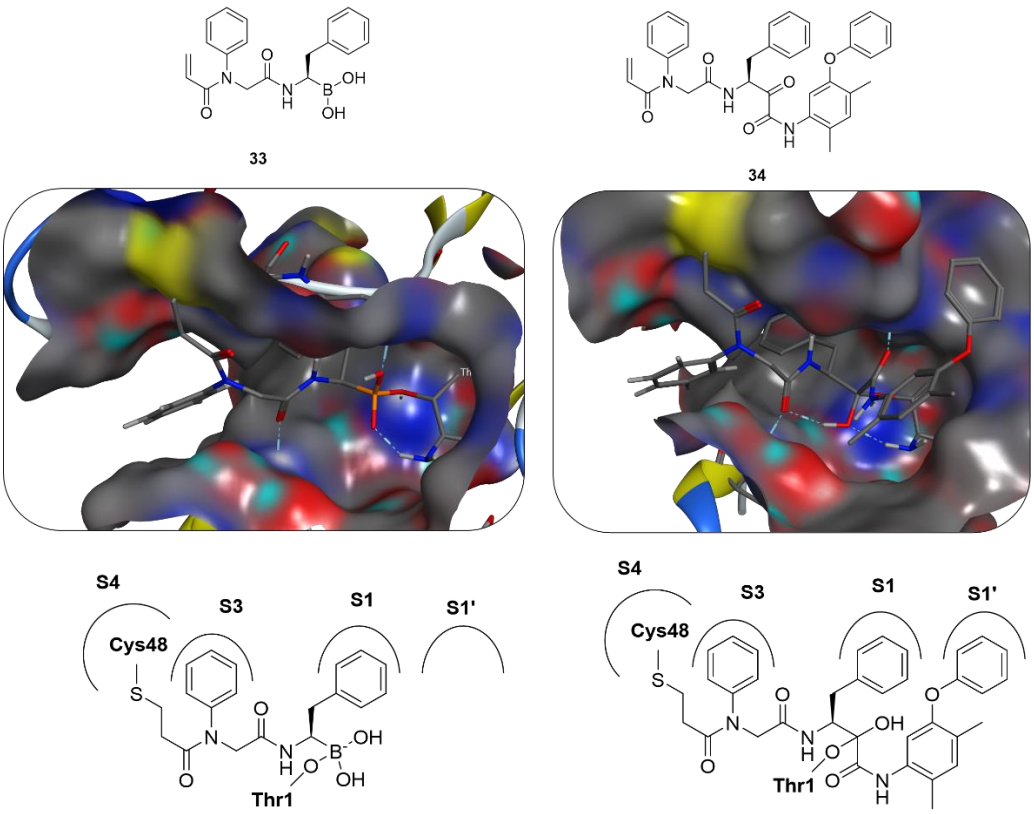


Abbildung 82. Modellierung des Bindungsmodus der dual-kovalent bindenden, Boronat- und Ketoamid-basierten Inhibitoren **33** und **34**.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Das zunehmende Verständnis genetischer Ursachen maligner, neoplastischer Erkrankungen führte in den letzten Jahren zu einer immer größer werdenden Anzahl innovativer Wirkstoffe, die im Rahmen klinischer Studien untersucht werden. Trotzdem ist der Anteil der neu zur Behandlung zugelassenen Wirkstoffe gering und wird von steigender Entwicklungszeit und -kosten begleitet. Gleichzeitig nimmt das Auftreten zytogenetisch differenzierter, Therapie-resistenter Krankheitsformen zu. Im Zusammenhang mit sozio-ökonomischen Herausforderungen, wie beispielsweise einer älter werdenden Gesellschaft und einer steigenden Anzahl maligner Erkrankungen muss die Kostenentwicklung und die Dauer, die zwischen der Grundlagenforschung und einer Markteinführung eines Wirkstoffes liegt, verringert werden. Ein Beitrag hierzu soll mit dieser Dissertation durch die Computer-gestützte Wirkstoffentwicklung von kovalent-bindenden Inhibitoren geleistet werden.
Hierfür wurden durch molekulare Modellierung entwickelte Wirkstoffe synthetisiert und in Zelllinien verschiedener Formen der akuten myeloische Leukämie untersucht. Diese stellen eine besonders große Herausforderung für die Wirkstoffentwicklung dar, da sie einen rapiden Krankheitsverlauf mit hohen Rezidiv-Raten haben und außerdem nur wenige zielgerichtete Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen.

4.1 Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Evaluierung von irreversiblen FLT3-Inhibitoren

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde eine virtuelle *Screening*-Methode entwickelt, um ausgehend von bekannten, reversiblen Inhibitoren von FLT3 das zielgerichtete Design kovalent-irreversibler Inhibitoren mit einer hohen Erfolgswahrscheinlichkeit zu ermöglichen.

Dazu wurde eine fokussierte *Screening*-Bibliothek von möglichen, irreversiblen Inhibitoren anhand von Bindungsmodellen in einem Homologie-Modell der aktiven FLT3-Kinase entwickelt, die von bereits bekannten reversiblen Inhibitoren abgeleitet sind. Die reversiblen Bindungshypothesen erlauben die Auswahl einer plausiblen Position zur Anknüpfung von elektrophilen Gruppen, um eine kovalente Modifikation sterisch überhaupt zu ermöglichen. Das anschließende kovalente *Docking* an Cys828

vor dem DFG-Motiv und die anschließende rationale Auswahl der im *Docking* erhaltenen Positionen hat zwei privilegierte Strukturmotive ergeben (Abbildung 83).

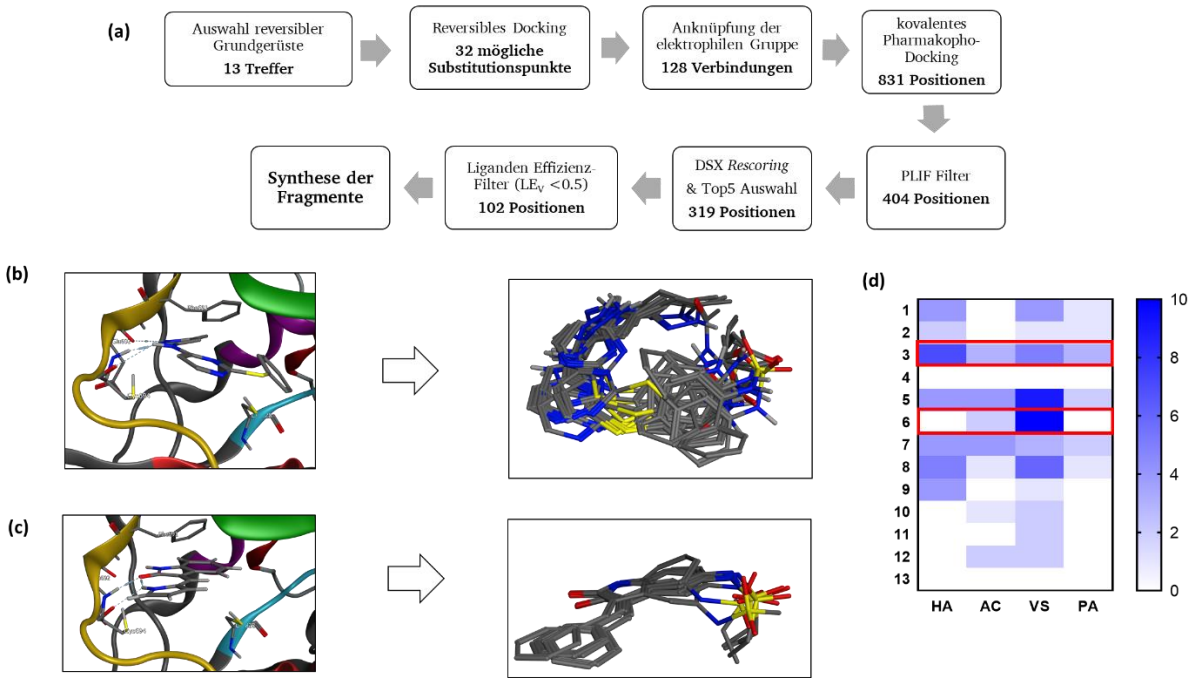


Abbildung 83. (a) Zusammenfassung der virtuellen *Screening*- und Filter-Strategie zur Entdeckung irreversibler Leitstrukturen. (b) Reversible und irreversible *Docking*-Positionen von Bisaminopyrimidin- und (c) Indolinon-basierten FLT3-Inhibitoren. (d) Verteilung der Treffer im virtuellen *Screening* nach elektrophiler Gruppe und Grundgerüst. HA: 2-Haloacetamid; AC: Acrylamid; VS: Vinylsulfonamid; PA: Propargylamid.

Die Synthese und anschließende biochemische Testung der Indolinon-basierten *Screening*-Treffer und der analogen reversiblen Inhibitoren zeigte eine deutlich stärkere Wirkung durch verschiedene elektrophile Derivate. Das Vinylsulfonamid **BSc5234** konnte in 5 der 102 *Docking*-Positionen des virtuelle *Screenings* identifiziert werden und stellt einen hoch effizienten Inhibitor der Zellviabilität der im biochemischen *Screening* verwendeten FLT3-abhänigigen MV4-11-Zelllinie dar und zeigt eine potente Inhibition von sowohl FLT3(ITD) als auch FLT3(D835Y). Das 2-Chloracetamid-Derivat **BSc5237** ist ähnlich effektiv, wurde im kovalenten *Screening* jedoch erst nach optimierten *Screening*-Parametern mit leicht vergrößerten Pharmakophor-Eigenschaften identifiziert. Die Hybridisierung mit dem ursprünglichen **Sunitinib**-Grundgerüst hat eine Reihe hoch potenter Inhibitoren ergeben, die selektiv zytotoxisch in FLT3-abhäniggien AML Zelllinien sind, nicht jedoch in FLT3wt und FLT3-negativen Zelllinien. Der aktivste Inhibitor der Serie, **BSc5371**, zeigt zudem ein deutlich geändertes Selektivitätsmuster in der Inhibition von nicht-Ziel Kinasen, im Vergleich zu **Sunitinib**.

Das ist ein Hinweis auf eine unterschiedliche Nukleophilie des konservierten Cys828 vor dem DFG-Motiv, das auch in eng verwandten, aber nicht inhibierten Kinasen vorliegt. Außerdem ist eine Stabilisierung, beziehungsweise Regulation des der Inaktivierung vorgelagerten, reversiblen Protein-Ligand-Komplexes durch den nicht-konservierten *Gatekeeper*-Rest denkbar. Hierfür konnten jedoch in der molekularen Modellierung keine Anhaltspunkte generiert werden, weshalb die kristallografische Untersuchung des Protein-Ligand-Komplexes im Mittelpunkt weiterer Arbeiten stehen sollte.

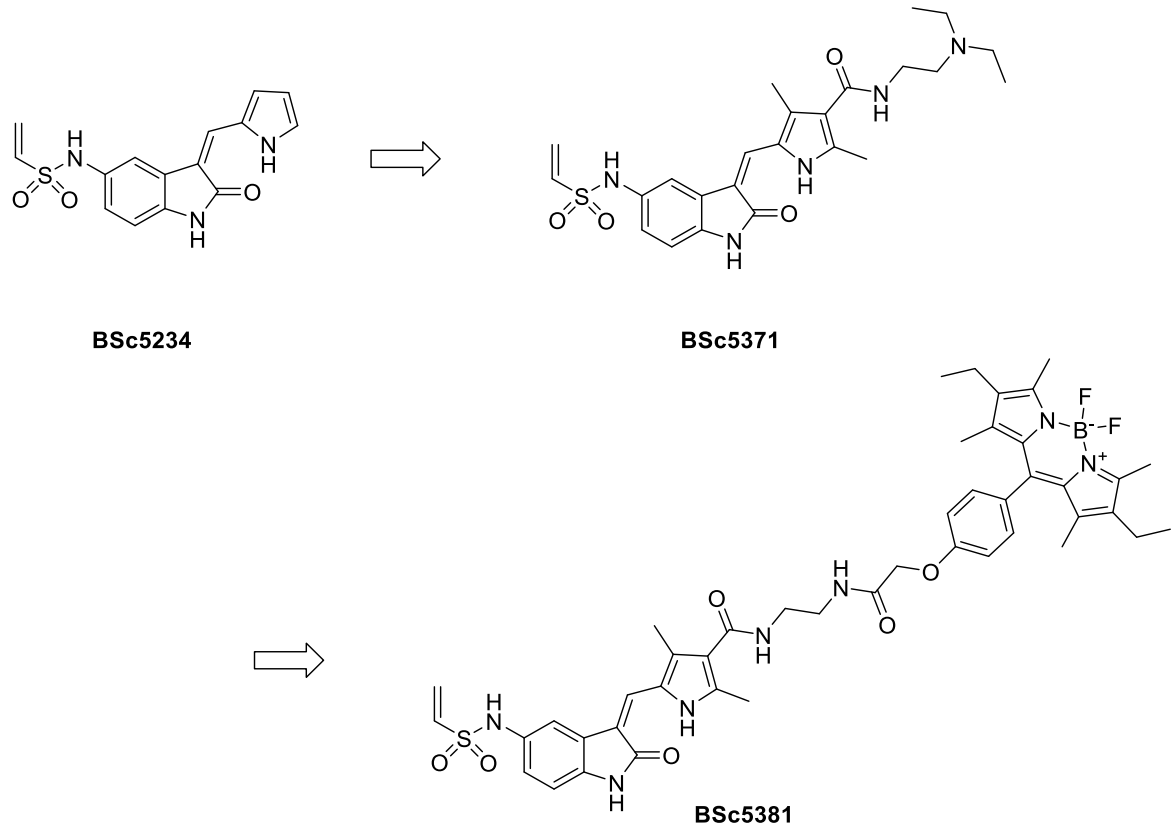


Abbildung 84. Struktur des Fragment-Treffers **BSc5234** und der Leitstruktur **BSc5371**.

Im Western-Blot Assay konnte eine Inhibition der phosphorylierten Form von FLT3 und des *Downstream*-Effektors STAT5 bereits im niedrigen nanomolaren Bereich nachgewiesen werden.

Durch die *KinomeScan*-Technologie war es zudem möglich, die Affinität für die aktive, DFG-*in* Form der Kinase zu bestimmen, wie es durch die kovalente Modellierung angenommen wurde. Zudem erhält die Leitstruktur **BSc5371** ihre Bindungsaffinität

gegenüber den FLT3-Mutationen der zweiten Generation, die typischerweise zu einem Rückfall der Krankheit führen.
Des Weiteren ist die zytotoxische Aktivität von **BSc5371** stärker als die des seit 2017 zur Behandlung der FLT3-mutierten AML zugelassenen Multi-Kinase-Inhibitors **Midostaurin**, sowie der in klinischen Entwicklung befindlichen Inhibitoren **Sunitinib**, **Crenolanib** und **Sorafenib**. Der Vergleich der zeitabhängigen zytotoxischen Wirkung zeigt eine 4-fach stärkere zytotoxische Wirkung für **BSc5371** nach kurzer Inkubationszeit im Vergleich zu **Crenolanib**, während eine frühzeitige Entfernung des Inhibitors jedoch zu einer geringeren zytotoxischen Wirkung führt.
Die Vinylsulfonamid-Derivate der Bisaminopyrimidine, **BSc5311** und **BSc5312**, zeigten ebenfalls eine höhere zytotoxische Effektivität als die analogen, reversiblen Inhibitoren und plausible Bindungsmodi im kovalenten virtuellen *Screening*, sind in ihrer zytotoxischen Wirkung jedoch deutlich weniger selektiv als die Indolinon-basierten Inhibitoren.

Die nachfolgende Entwicklung der Aktivität-basierten kovalenten Sonde **BSc5381** erlaubte zum ersten Mal die kompetitive, fluorometrische Untersuchung des Bindungsmodus von FLT3-Inhibitoren und zeigte eine kompetitive Bindung nach Vorinkubation mit hoch potenten, reversiblen Inhibitoren.

Die in dieser Dissertation vorgestellte Strategie stellt den ersten Ansatz eines *in silico* entwickelten, irreversiblen Kinase-Inhibitors dar, der die Überwindung von Therapie-resistenten Mutationen der FLT3-Kinase erlaubt. Diese *Screening*-Strategie ist in ihrem Grundsatz auf alle Wirkstoffziele und Inhibitor-Klassen anwendbar und ermöglicht eine Zeit- und Kosten-effizientere Wirkstoff Entwicklung.

Dennoch müssen anhand der in dieser Arbeit entwickelten Methoden und Strategien neue, von **BSc5371**-abgeleitete Leitstrukturen mit optimierten Eigenschaften entwickelt werden. So ist ein zentrales Problem der Leitstruktur **BSc5371** die geringe Halbwertszeit in Gegenwart hoher Glutathion-Konzentrationen, was zu einer frühen Inaktivierung und somit zu einer geringeren zellulären Aktivität, als durch diesen Ansatz vermutlich erreicht werden kann, führt. Deshalb müssen neue elektrophile Gruppen entwickelt werden, die modulierbare sterische und elektronische

Eigenschaften haben, um gezielt auf Besonderheiten eines Zielenzyms eingehen zu können und somit die Selektivität und Stärke der biochemischen Wirkung zu erhöhen. So kann beispielsweise eine pentazyklische Form des Vinylsulfonamids in **BSc5234** bzw. **BSc5371** in 5-Position eingeführt werden (Abbildung 85). Die Z-Konformation des Vinyls ist im kovalenten *Docking* vorteilhaft und es folgt durch die kovalente Bindung ein entropischer Vorteil, da durch Bindung an den Rezeptor weniger Rotationsfreiheitsgrade verloren gehen. Im kovalenten *Docking* zeigt sich der klare Trend zur Addition zum *(R)*-Enantiomer dieser hypothetischen Leitstruktur, wobei eine bidentate Wasserstoffbrückenbindung der Sulfon-Sauerstoff-Atome zum Lys644, welche auch schon durch das einfache Vinylsulfonamid beobachtet wurde, in diesem Fall jedoch noch ausgeprägter ist.

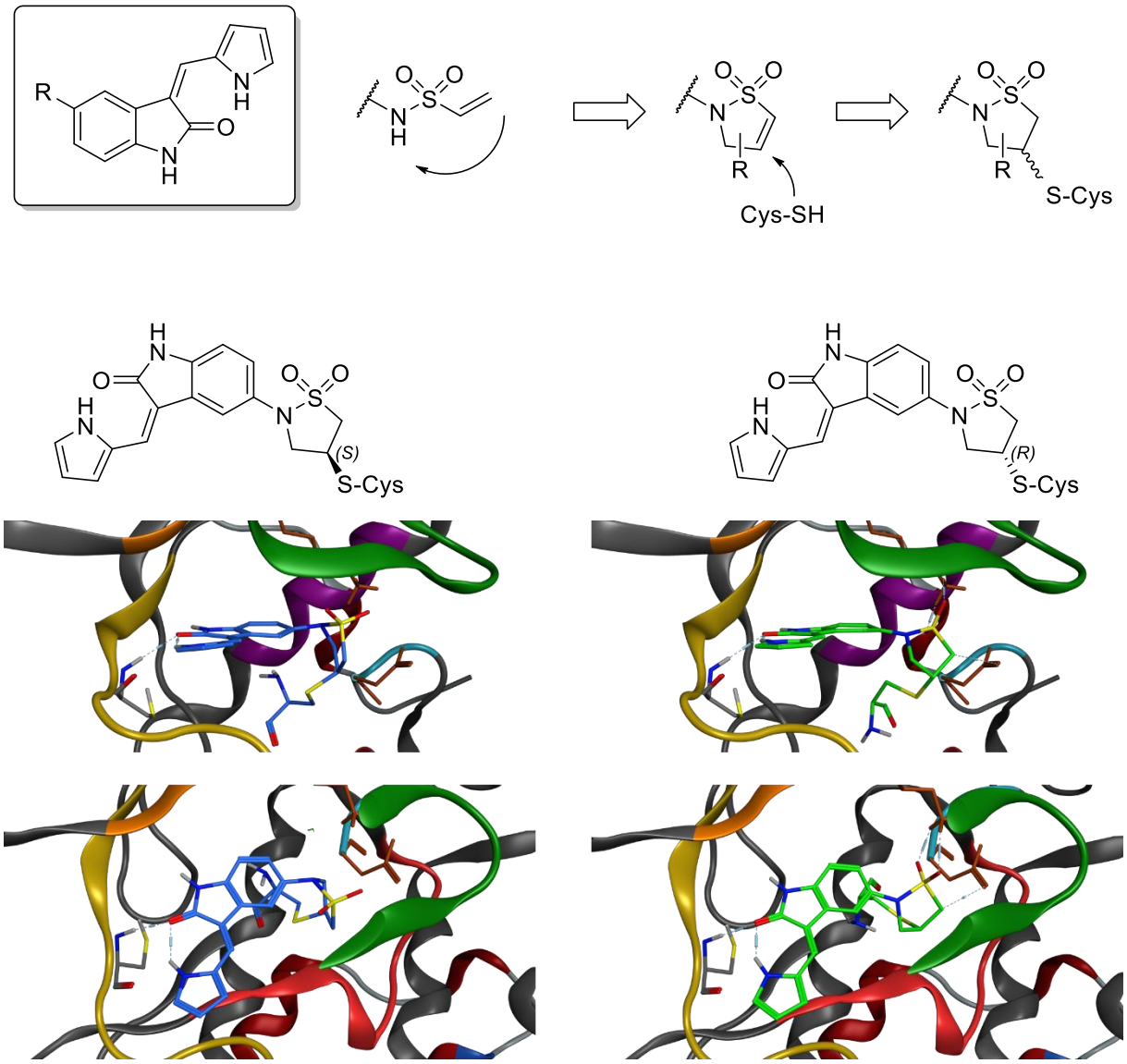


Abbildung 85. Aus den virtuellen *Screening*-Treffer **BSc5234** abgeleitete neue Leitstruktur.

Zudem ist die Elektronendichte am C^{β}-Atom erhöht, was zu einer langsameren Aktivierung durch Glutathion führen sollte. Außerdem ist eine Variation der Ringspannung denkbar, wodurch ebenfalls eine veränderte Reaktivität modulierbar sein sollte. Ein weiteres Problem von **BSc5371** stellt die geringe Kinase-Selektivität des zugrunde liegenden **Sunitinib**-Inhibitors dar. Zwar ist diese in **BSc5371** erhöht, aber dennoch gibt es recht starke *off-target* Inhibitionen. Dies kann zwar im Rahmen einer synergistischen Wirkung vorteilhaft sein, erschwert aber die rationale, klinische Entwicklung und kann zu Nebenwirkungen führen. Ein besser geeignetes Grundgerüst für die Entwicklung neuer Leitstrukturen könnte das Imidazopyridin-Grundgerüst darstellen (Abbildung 80). Dieses kann durch seinen mono-dentaten Bindungsmodus an der *Hinge*-Region deutlich selektiver gegenüber anderen Kinasen sein. Die Verwendung von benzylischen Michael-Akzeptoren führt zum einen zu einer geringeren Reaktivität von Michael-Akzeptoren gegenüber Glutathion und erlaubt einen *induced fit* mit der Kinase, da die Hyperkonjugation der sp^2-Orbitale der Amid-Gruppe mit dem aromatischen Grundgerüst aufgehoben ist. Somit steht ein größerer sterischer Raum für eine kovalente Inaktivierung zur Verfügung. Um eine Vorzugsgeometrie des Inhibitors zu erlauben und den entropischen Verlust durch Bindung an die Kinase zu verringern empfiehlt sich in diesem Schritt, wie im kovalenten *Docking* ersichtlich wird, eine makrocyclische Derivatisierung durchzuführen. Durch Einführung von verschiedenen Donor- und Akzeptor-Substitutionen in der Solvens-exponierten Seite der Kinase können Wechselwirkungen mit Asn^{698} und Asn^{701} eingegangen werden, ähnlich wie bei dem verwendeten Indolinon-Derivat.

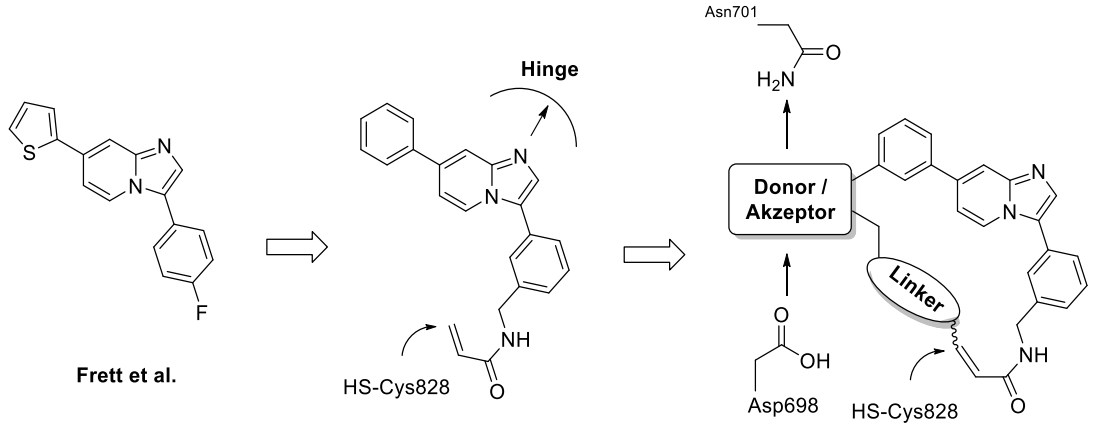


Abbildung 86. Aus den virtuellen *Screening*-Treffern der Imidazo[1,2-a]pyridin-abgeleitete, neue Leitstrukturen zur Inhibition von FLT3.

Somit kann die Stabilität und damit die Verweilzeit des reversiblen, der Inaktivierung vorgelagerten Komplexes erhöht werden. Zudem ergeben sich durch die Kombination verschiedener Donor-Akzeptor-Substituenten neue Möglichkeiten die Selektivität gegenüber anderen Kinasen zu modulieren.

4.2 Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Evaluierung von kovalent-reversibel bindenden Proteasom-Inhibitoren

Kovalent-reversible Inhibitoren des Proteasoms, wie die peptidischen Boronsäuren, stellen die erste zugelassene Wirkstoffgruppe der Proteasom-Inhibitoren dar. Trotzdem ist ihre Erforschung in der Wirkstoffentwicklung in der letzten Dekade weniger Bedeutung zugemessen worden als kovalent-irreversibel bindenden Inhibitoren, die über eine Epoxyketon- oder Sulfonylfluorid-Gruppe als elektrophilen *Warhead* verfügen. Außerdem wurden die Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Inhibitoren, die die gestrichene Seite des Bindekanals der β5-Untereinheit besetzen, bisher nur vereinzelt untersucht. Ein Beispiel hierfür stellen α-Ketoamide wie **BSc2189** oder **BSc4999** dar, die jedoch keine Spezifitätstasche der gestrichenen Seite gezielt adressieren und in ihrer zellulären Aktivität zum Teil deutlich schwächer sind als die zurzeit klinisch zugelassenen Inhibitoren. Durch die Einführung der Phenylamid-Gruppe wurde jedoch die Exploration der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen in der gestrichenen Bindetasche möglich. Um diese zu untersuchen, wurde basierend auf der Kokristallstruktur von **BSc4999** mit dem yCP mit Hilfe der molekularen Modellierung *ortho*-, *meta*- und *para*-Phenylether Substitution in der S1‘-Tasche und drei verschiedene Gruppen als Ersatz für die Cbz-Schutzgruppe in P4 identifiziert, die durch Variation der Struktur des kokristallisierten Liganden und nachfolgende Energieminimierung der neuen Inhibitoren plausible Positionen in der β5-Untereinheit ergaben. Durch iterative Synthese und Bereitstellung der Zielstrukturen für die biochemischen Untersuchung im Rahmen dieser Dissertation konnte das α-Ketoamid **BSc5376** als aktivste Struktur in MV4-11 Leukämiezellen identifiziert werden. Hierbei ergab sich jedoch durch den anfänglich gewählten, einfachen Modellierungsansatz keine Erklärung für die besondere Aktivität dieser Verbindung, weshalb eine neue *Docking*-Strategie entwickelt wurde. Diese ermöglichten zum ersten Mal eine effiziente, kovalente *de novo* Modellierung auch von tripeptidischen Inhibitoren, die sowohl die gestrichene als auch die ungestrichene Seites des Bindekanal der β5c-Untereinheit

besetzen. Dadurch konnten Hypothesen für zwei zentrale Wirkungen durch **BSc5376** identifiziert werden, die in **BSc4999** nicht vorliegen. Zum einen erlaubt die *meta*-Phenylether-Substitution vermutlich die vollständige Besetzung der S1‘-Tasche. Dies wird auch an der hohen Übereinstimmung mit der Kristallstruktur des Naturstoffes **Homobelactosin C** deutlich, die eine sehr ähnliche Konformation des Phenylrings wie **BSc5376** in S1‘ zeigt. Zum anderen konnte eine Erklärung gegeben werden, weshalb die 2,5-Dichlorbenzamid-Gruppe in P4 zu einer deutlich höheren Aktivität führt. Diese liegt im *Docking* bevorzugt nicht in der S4-Tasche, wie die ursprüngliche Cbz-Schutzgruppe in **BSc2189** und **BSc4999**, sondern liegt durch eine Drehung der P3 Gruppe (Leucin) zum Solvens nun in der S3-Tasche. Durch die größere Phenylamid-Gruppe im Vergleich zur Leucin-Seitenkette wird die Verdrängung von drei Wassermolekülen möglich, die in der Kokristallstruktur von **BSc4999** vorliegen und somit einen entropischen Vorteil darstellt.

Während in MV4-11-Zellen der klinisch zugelassene β5c-selektive Inhibitor **Carfilzomib** die größte zytotoxische Aktivität zeigt, ist die Leitstruktur **BSc5376** in Jurkat-Zellen aktiver. In beiden Zelllinien sind sowohl die Ausgangsstruktur **BSc4999** als auch das *meta*-Phenylether Derivat **BSc5322** weniger aktiv, und dies korreliert mit der Aktivität der Inhibitoren gegen das isolierte Proteasom. Beide Inhibitoren verlieren jedoch massiv zytotoxische Aktivität in THP-1 Zellen. Für diese wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass eine höhere Expression und damit höherer relativer Einbau der β5i-, β2i- und β1i-Untereinheiten vorliegt. Damit führt die bevorzugte Inhibition der β5c-Einheit durch **Carfilzomib** und **BSc5376** zu einer geringeren Wirkung auf die β5i-exprimierenden Zellen.

Interessanterweise liegt in β5i-selektiven Inhibitoren wie **ONX0914** bevorzugt Alanin in P3, was durch den großen P3-Rest von **BSc5376** dessen geringere Wirkung in THP1-Zellen erklärt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte zudem ein direktes, zellbasiertes Assay zur Bestimmung der Inhibition des Proteasoms in lebenden Zellen etabliert werden. Durch das in der Arbeitsgruppe entwickelte Substrat **BSc5098** ist eine deutlich sensitivere Untersuchung möglich als mit dem bisher verwendeten Standard-Substrat

Suc-LLVY-AMC. Dabei konnte erstmals die Zeitabhängigkeit der Proteasom-Inhibition in Leukämiezellen durch irreversible und kovalent-reversible Inhibitoren verglichen und mit der zytotoxischen Wirkung der Inhibitoren korreliert werden. Es zeigt sich zudem für **Carfilzomib**, nach einer initial starken Inhibition des Substratumsatzes in THP-1 Zellen, eine deutliche Abnahme, die vermutlich zur geringen zytotoxischen Wirkung führt und die Folge einer partiellen Resistenzbildung, etwa durch Überexpression des Immunoproteasoms oder Deaktivierung des Inhibitors, sein kann. Um diesen Mechanismus aufzuklären sind jedoch intensive, biochemische Folgestudien nötig.

Die Leitstruktur **BSc5376** wurde zusätzlich in einem Zebrafisch-Embryonen Fluchtreflex-Assay untersucht. Der zur Behandlung verschiedener nicht-solider Neoplasien zugelassene, aber wenig selektive Proteasom-Inhibitor **Bortezomib** zeigt hier eine starke Einschränkung der sensorischen Reaktion als auch des Bewegungsablaufes des Fluchtreflexes und wird vermutlich durch Inhibition von nicht-Ziel Proteasen, wie etwa von Htra2/Omi hervorgerufen. Diese führt in der klinischen Verwendung zur Dosis-limitierenden peripheren Neuropathie in Patienten und beeinträchtigt den Behandlungserfolg. Im Gegensatz hierzu zeigt sich für die mit **BSc5376**-behandelten Zebrafisch-Embryonen ein ähnlicher Fluchtreflex wie in der Kontrollgruppe, weshalb eine deutlich selektivere Inhibition des Proteasoms vermutet wird. Dieses Assay sollte in Zukunft zur präklinischen Einschätzung der Sicherheit von Wirkstoffen häufiger eingesetzt werden, wobei eine breitere Auswahl von Wirkstoffen getestet und mit den klinischen Daten verglichen werden sollte.

Zusätzlich konnte basierend auf der Software DOCKTITE, zum ersten Mal eine Strategie für die bikovalente Modellierung von Inhibitoren, die zwei nukleophile Reste in einer Bindetasche durch nur einen Inhibitor angreifen, entwickelt werden. Diese erlaubt das virtuelle *Screening* von neuen, bikovalent-bindenden Liganden und ist nicht nur auf die β5i-Untereinheit des Proteasoms anwendbar, sondern prinzipiell in allen Proteinen, die zwei Nukleophile in derselben Bindetasche vorweisen.

In Zukunft sollten verschiedene Punkte der Struktur-Aktivitätsbeziehungen von iCP und cCP-Inhibitoren verstärkt untersucht werden (Abbildung 87):

- Exploration selektiver Interaktionen mit Ser116, Glu117 (β5c) oder Glu116, His117 (β5i) in der S1‘-Tasche durch Variation der Reste des Phenylethers,
- Optimierung des Aminosäure-Restes in P1 zur Entwicklung nicht-peptidischer Inhibitoren,
- Einführung eines Makrozyklus zwischen den Resten in P2 und P4.

Durch diese Struktur-Aktivitätsbeziehungen sind mehrere Vorteile gegenüber herkömmlichen Inhibitoren möglich. Zum einen können diese oral verfügbar werden, da entweder keine peptidischen Strukturen mehr nötig sind oder diese in einem Makrozyklus so geschützt werden, dass ein geringerer Abbau durch Proteasen wie Chymotrypsin vorliegt. Zudem kann Selektivität zwischen der β5c und der β5i-Untereinheit durch Einführung von Alanin in P1 (β5c- Inhibition gegen β5i bevorzugt) oder durch Einführung von Ala in P3 (β5i- Inhibition gegen β5c bevorzugt) erzeugt werden. Anhand der *Docking*-Ergebnisse wird vermutet, dass die Adressierung der nicht-konservierten Reste in der S1‘-Tasche, also Ser116 und Glu117 in β5c oder Glu116, His117 in β5i eine deutlich effizientere Modulierung der Selektivität erlaubt, da typischerweise durch Einführung der Ala-Reste zwar die Selektivität steigt, aber auch die Bindungsstärke gegenüber der favorisierten Untereinheit sinkt.

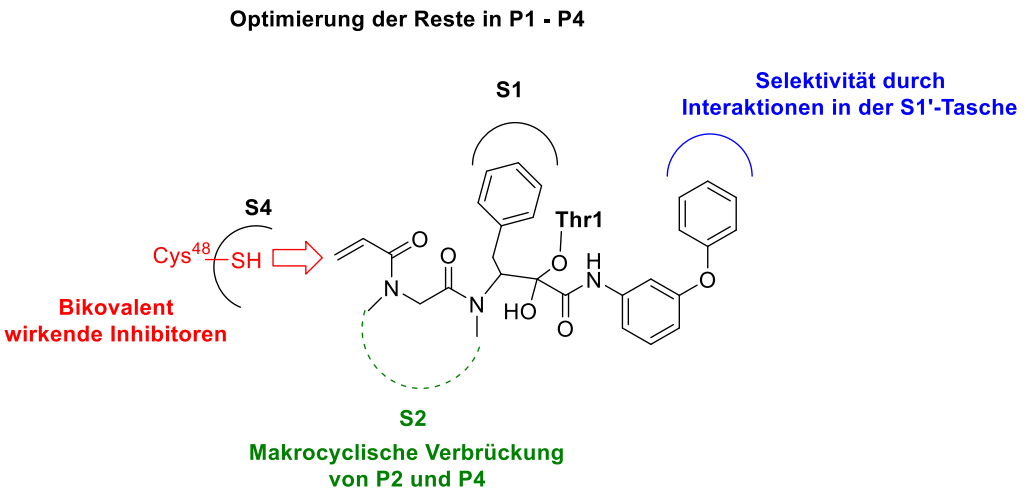


Abbildung 87. Übersicht möglicher Ansätze zur weiteren Entwicklung der Ketoamid-Leitstruktur.

5. Experimenteller Teil

5.1 Molekulare Modellierung

5.1.1 Entwicklung eines DFG-*in* Homologie Modells von FLT3

Die Proteinsequenz von FLT3 (PDB: 1RJB) und die Struktur von cKIT im Komplex mit ADP (PDB: 1PKG) wird von der *Protein Data Bank* bezogen. Die Sequenzen werden nach dem Kinaseschema annotiert und zueinander ausgerichtet (Abbildung 82). Aminosäuren, die nicht in beiden Strukturen aufgelöst und in allen Fällen von der ATP-Bindestelle entfernt sind, werden verworfen. Das Homologiemodell wird mit der Sequenz von FLT3 erstellt und auf die Vorlage von cKIT bezogen, indem 25 Hauptkettenmodelle mit dem Amber12:EHT-Kraftfeld erzeugt werden.

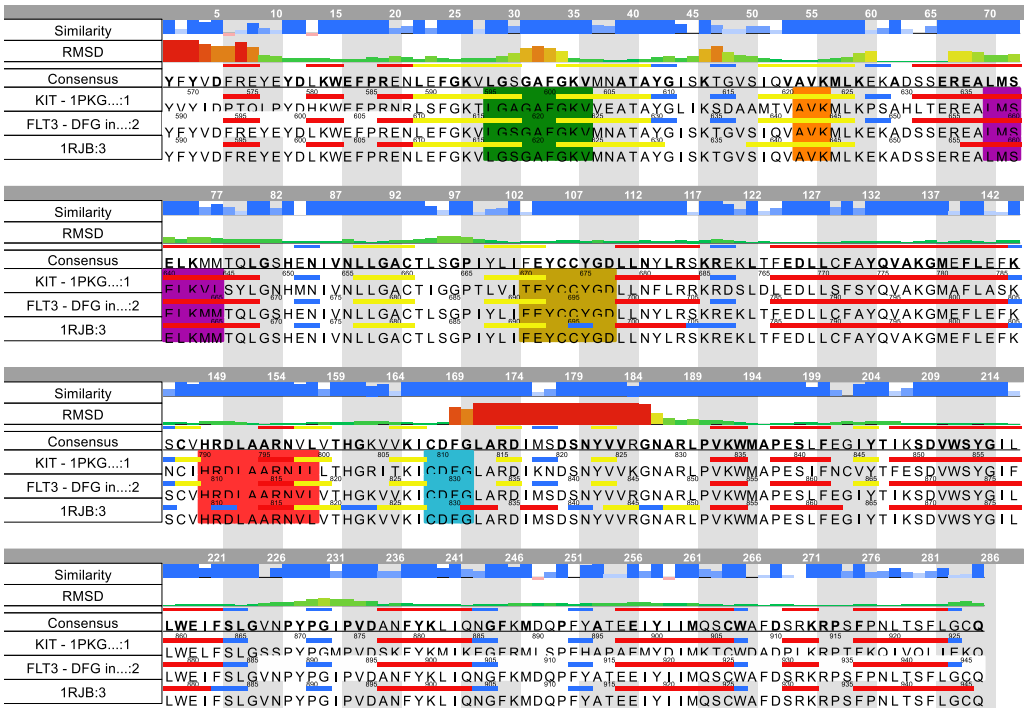


Abbildung 88. Vergleich der Sequenzen-Ähnlichkeit (*Similarity*) und Konformationen (RMSD) zwischen FLT3 in der inaktiven, DFG-*out* Konformation (PDB: 1PKG), cKIT in der aktiven Konformation (PDB: 1PKG) und dem FLT3-DFG-*in* Homologie-Modell.

5.1.2 Strukturbasiertes Design von irreversiblen FLT3-Inhibitoren

5.1.2.1 Molekulares *Docking* von reversibel bindenden FLT3 Inhibitoren

Die initialen Pharmakophor-Modelle zur Bindung reversibler FLT3 Inhibitoren an die *Hinge*-Region von FLT3 werden durch Überlagerung bekannter Kokristall-Strukturen der Inhibitoren mit anderen Kinasen erzeugt. Anschließend wird ein reversibles *Docking* durchgeführt, wobei der Pharmakophor in der ATP-Bindestelle zur Platzierung des Inhibitors verwendet wird und anschließend durch Kraftfeld-basierte Verfeinerung an der Bindestelle energieminimiert wird (Amber10:EHT). Die am höchsten bewerteten *Docking*-Pose (London dG) und die daraus definierten Pharmakophore werden dann als neue Vorlage für das kovalente, virtuelle *Screening* verwendet (siehe Abbildung 83 bis 95). Die Eingangsstrukturen werden mit Chemdraw gezeichnet und in MOE mit dem MMFF94X Kraftfeld energieminimiert.

5.1.2.2 Kovalentes *Docking* von irreversibel bindenden FLT3-Inhibitoren

Für das kovalente *Docking* wird das in der Arbeitsgruppe Schmidt entwickelte SVL-basierte Skript-Paket DOCKTITE für MOE verwendet. Dabei dient der reversibel gedockte Ligand als Indikator für die Bindestelle, an die gedockt wird, und zugleich sind an ihm die Pharmakophor-Eigenschaften des jeweiligen Grundgerüsts definiert, die für die initiale Platzierung des Liganden im *Docking* verwendet werden. Die Eingangsstrukturen für die kovalente Modellierung werden durch Modifikation des reversiblen Inhibitors mit elektrophilen Gruppen in einer geeigneten Position (5 Å Abstand zu Cys828) erzeugt. Die elektrophile Gruppe wird mit dem DOCKTITE-Skript markiert und mit der nukleophilen Seitenkette verknüpft, wobei 160 Liganden erzeugt werden, die an die Pharmakophore-Eigenschaften von Cys828 (d = 0.4 Å) in das FLT3 DFG-*in* Homologiemodell gedockt werden. Das Pharmakophor wird dabei durch die ausgewählten Pharmakophor-Eigenschaften des reversiblen Liganden ergänzt (d = 1.5 Å). Das Cys828S^{γ} Pharmakophor wird auf 3.0 Å erhöht, um eine induzierte Anpassung der Seitenkettengeometrie an den kovalent bindenden Liganden zu ermöglichen. Die Atome von Cys828 sowie der N- und C-seitig angrenzenden Amid-

Gruppen werden gelöscht, um eine Platzierung der gebundenen Liganden in das Proteinrückgrat zu ermöglichen. Das *Docking* wird dann mit der Pharmakophor Platzierungsmethode von MOE gestartet, wobei der Rezeptor rigide gehalten wird. Von jedem verknüpften Liganden werden bis zu 5000 Konformationen gesammelt, indem die Bindungen des Moleküls rotiert werden und diese dann anhand des Pharmakophor-Modells gefiltert werden. Die Bewertung der *Docking* Positionen erfolgt wiederum mit der London dG Bewertungsfunktion und die 100 Molekülpositionen mit der niedrigsten Energie werden anschließend mit der Raster-basierten Energieminimierungsfunktion verfeinert und noch einmal mit *London dG* bewertet. Die Kraftfeld-Konstante wird dafür auf 1 x 10^9 gesetzt. Das *Docking* wird nacheinander mit dem zugehörigem Pharmakophor und Liganden durchgeführt und dauert ca. 48 h auf einem 64-Bit Computersystem (Intel i7-4790K CPU, 4 x 4 GHz, (8 GB Ram, 2800 MHz). Nach dem *Docking* wird die Seitenkette vom Inhibitor abgespalten. Dadurch werden 831 *Docking*-Positionen erhalten, die mit der Wissens-basierten DSX-*Scoring*-Funktion neu bewertet werden. Dazu wird das ursprüngliche FLT3-Homologiemodell und die entsprechende Linux-basierte Software verwendet.

Grundgerüst 1: N^2,N^4-Diphenylpyrimidin-2,4-diamin

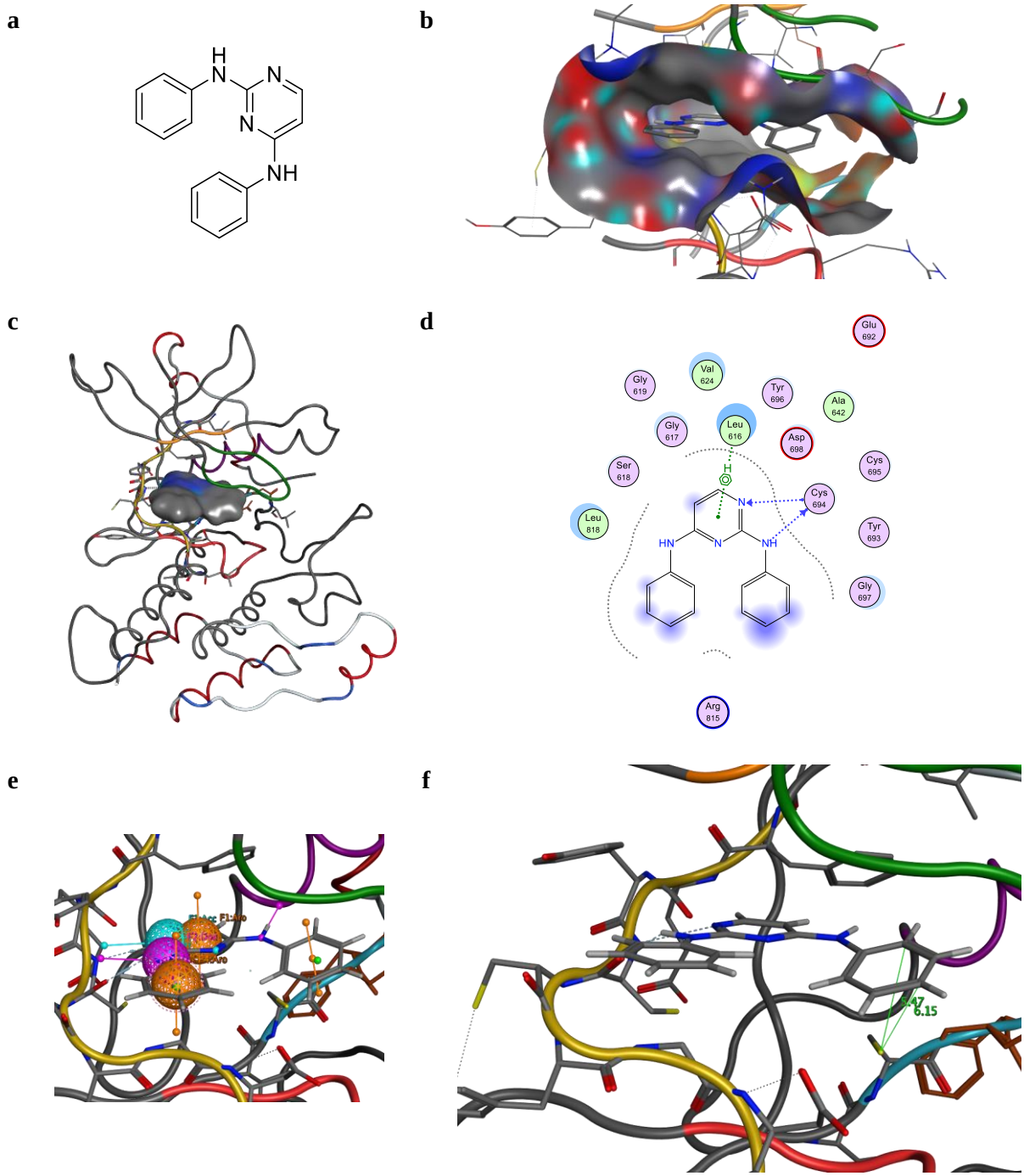


Abbildung 89. (a) Struktur des Grundgerüsts 1. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys[828].

Grundgerüst 2: *N*-(Pyridin-2-yl)-9*H*-pyrido[4',3':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-amin

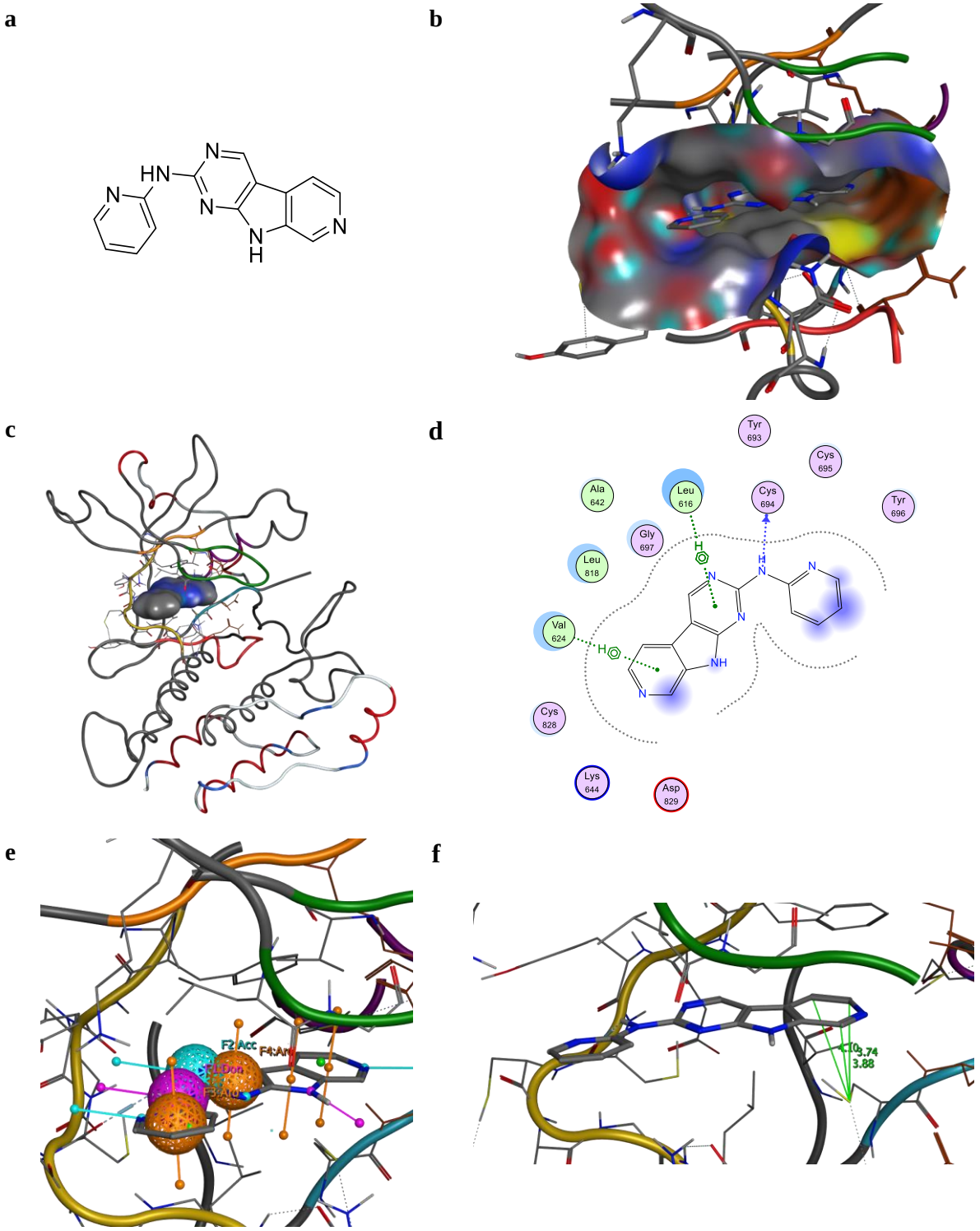


Abbildung 90. (a) Struktur des Grundgerüsts 2. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 3: *N*-(5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-2-(phenylthio)pyrimidin-4-amin

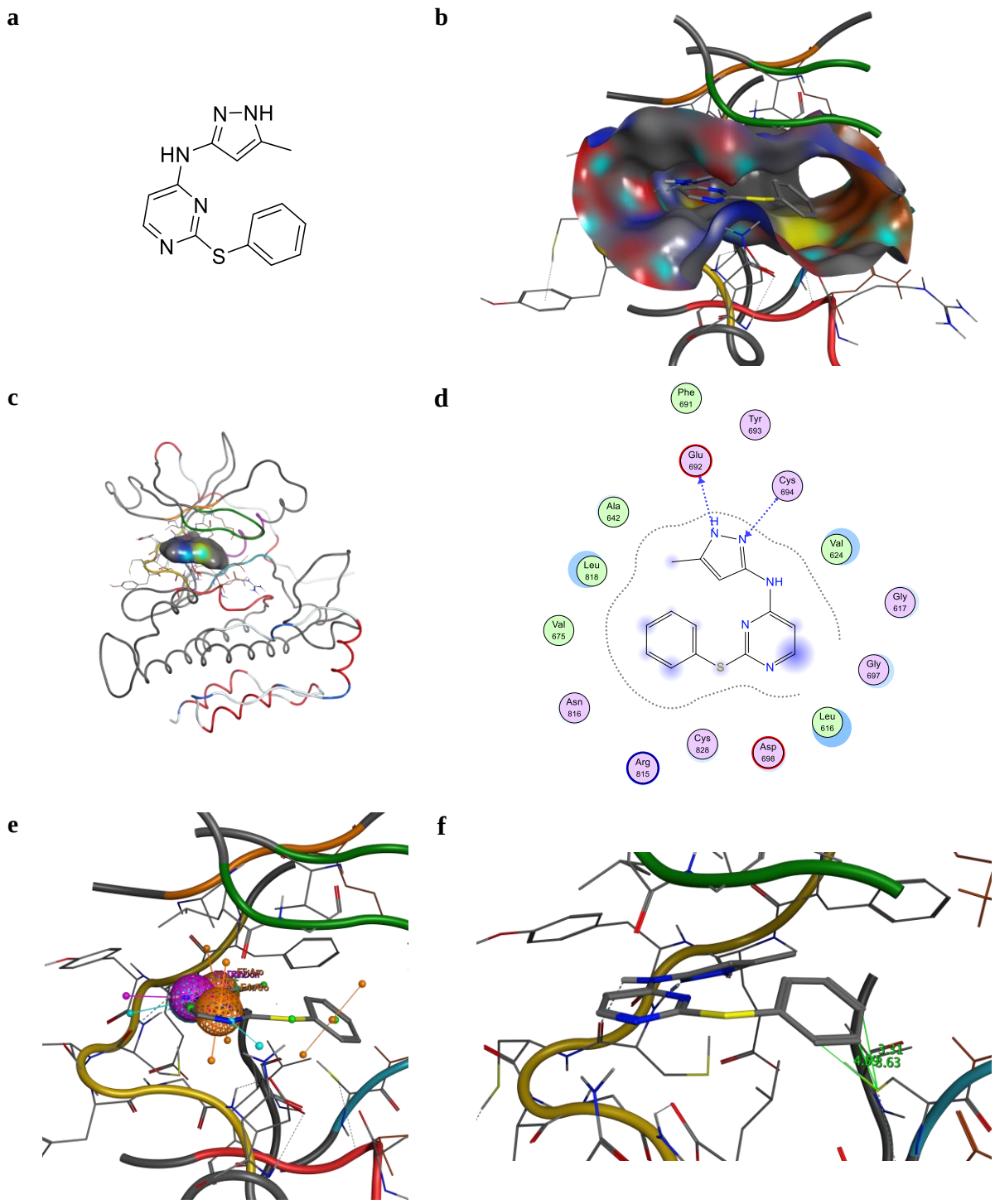


Abbildung 91. (a) Struktur des Grundgerüsts 3. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 4: *N*,4-Diphenylpyrimidin-2-amin

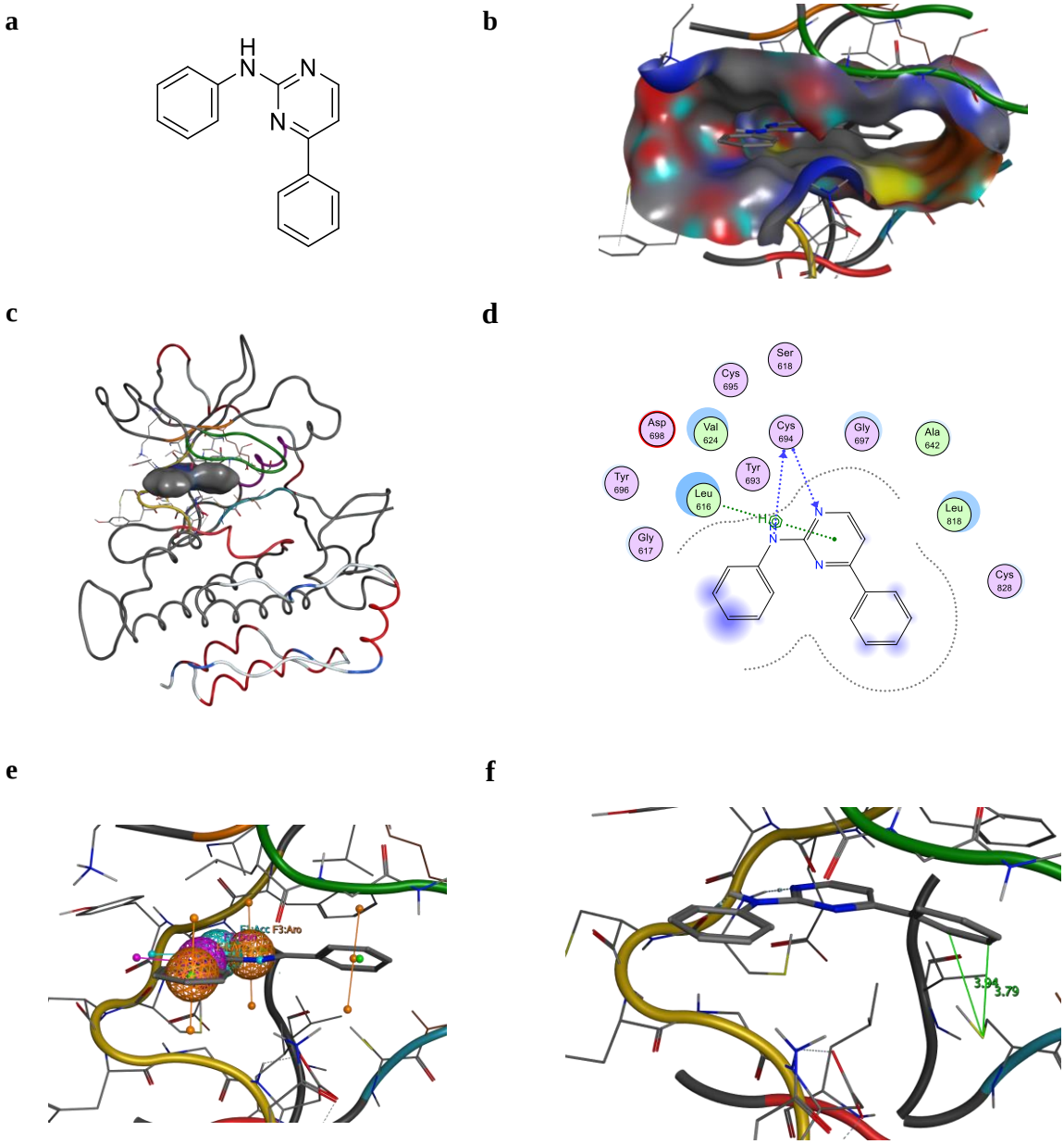


Abbildung 92. (a) Struktur des Grundgerüsts 4. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 5: 3,5-Diphenyl-1*H*-pyrrolo[2,3-b]pyridin

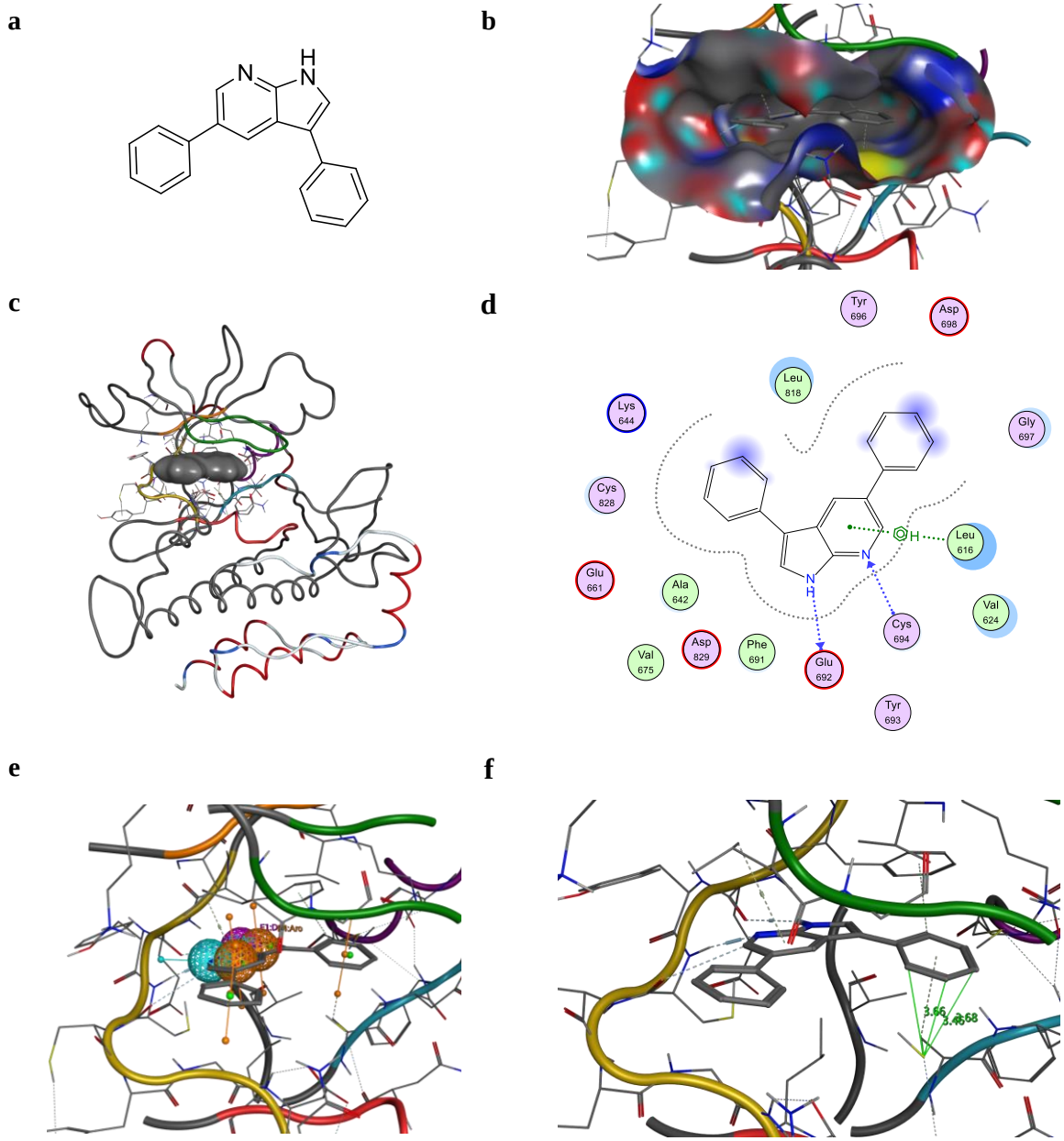


Abbildung 93. (a) Struktur des Grundgerüsts 5. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 6: (*Z*)-3-((Phenyl)methylen)indolin-2-on

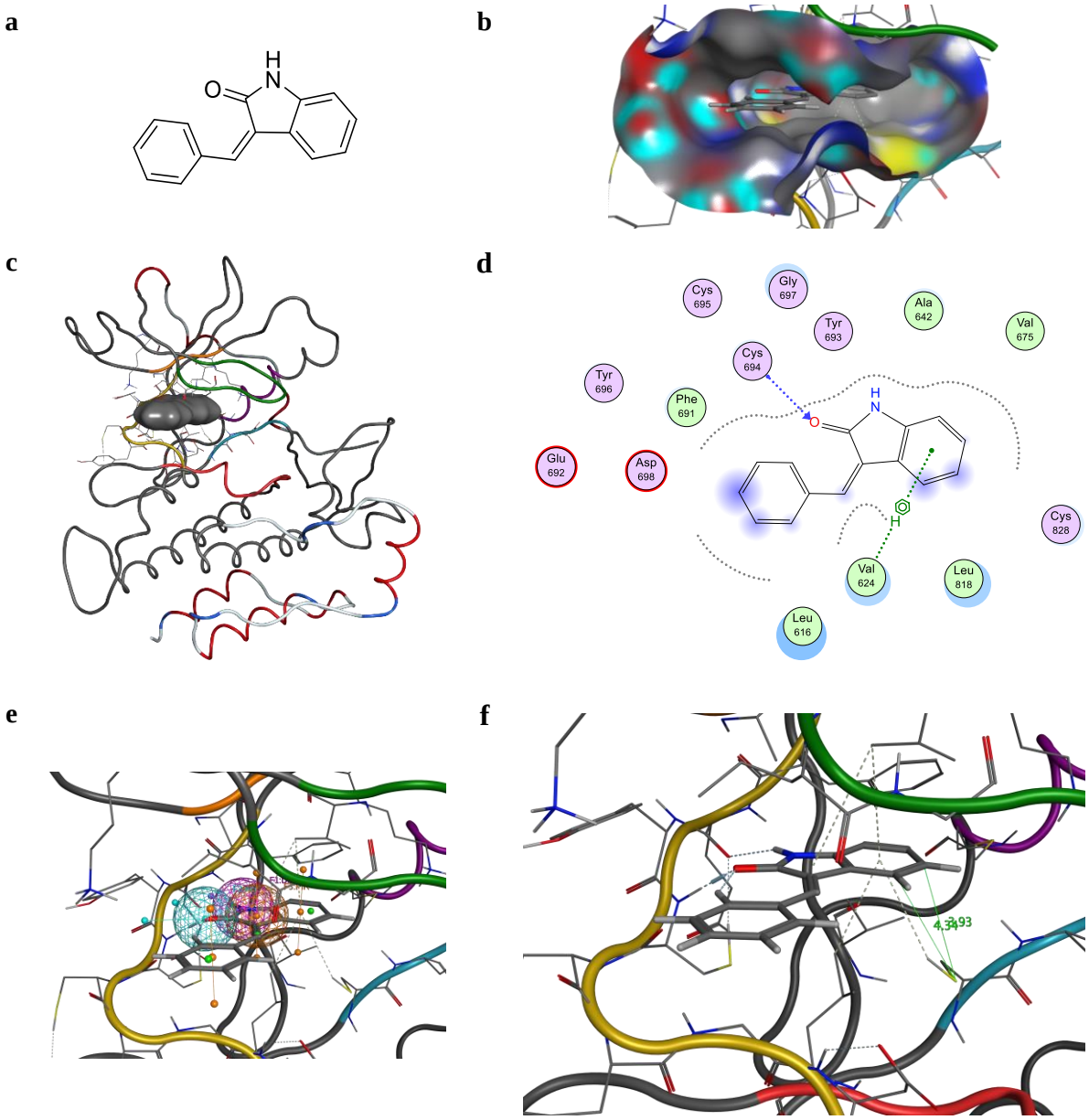


Abbildung 94. (a) Struktur des Grundgerüsts 6. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 7: 3-Phenylimidazo[1,2-*a*]pyridin

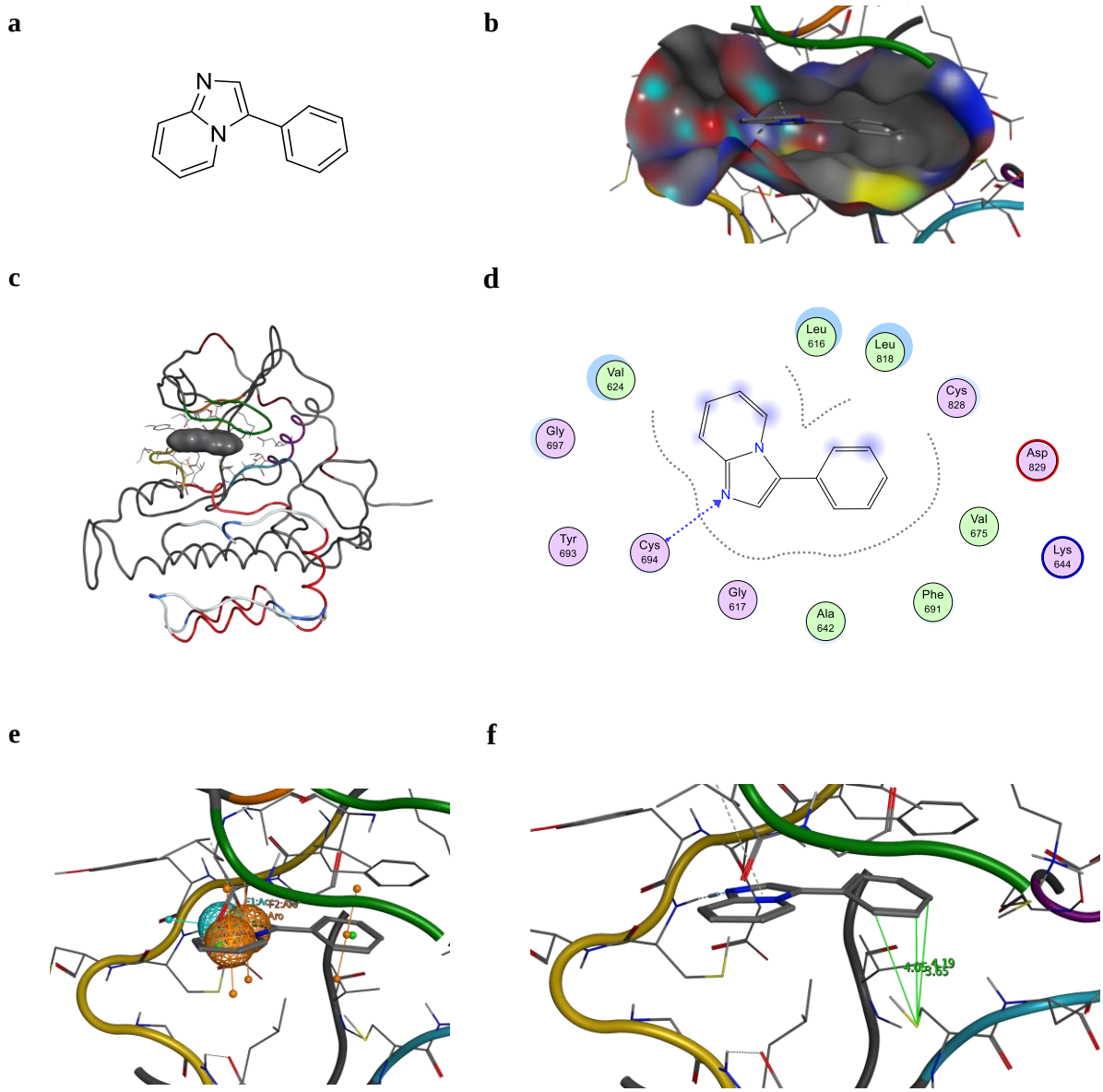


Abbildung 95. (a) Struktur des Grundgerüsts 7. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys[828].

Grundgerüst 8: *N*-Phenylchinazolin-4-amin

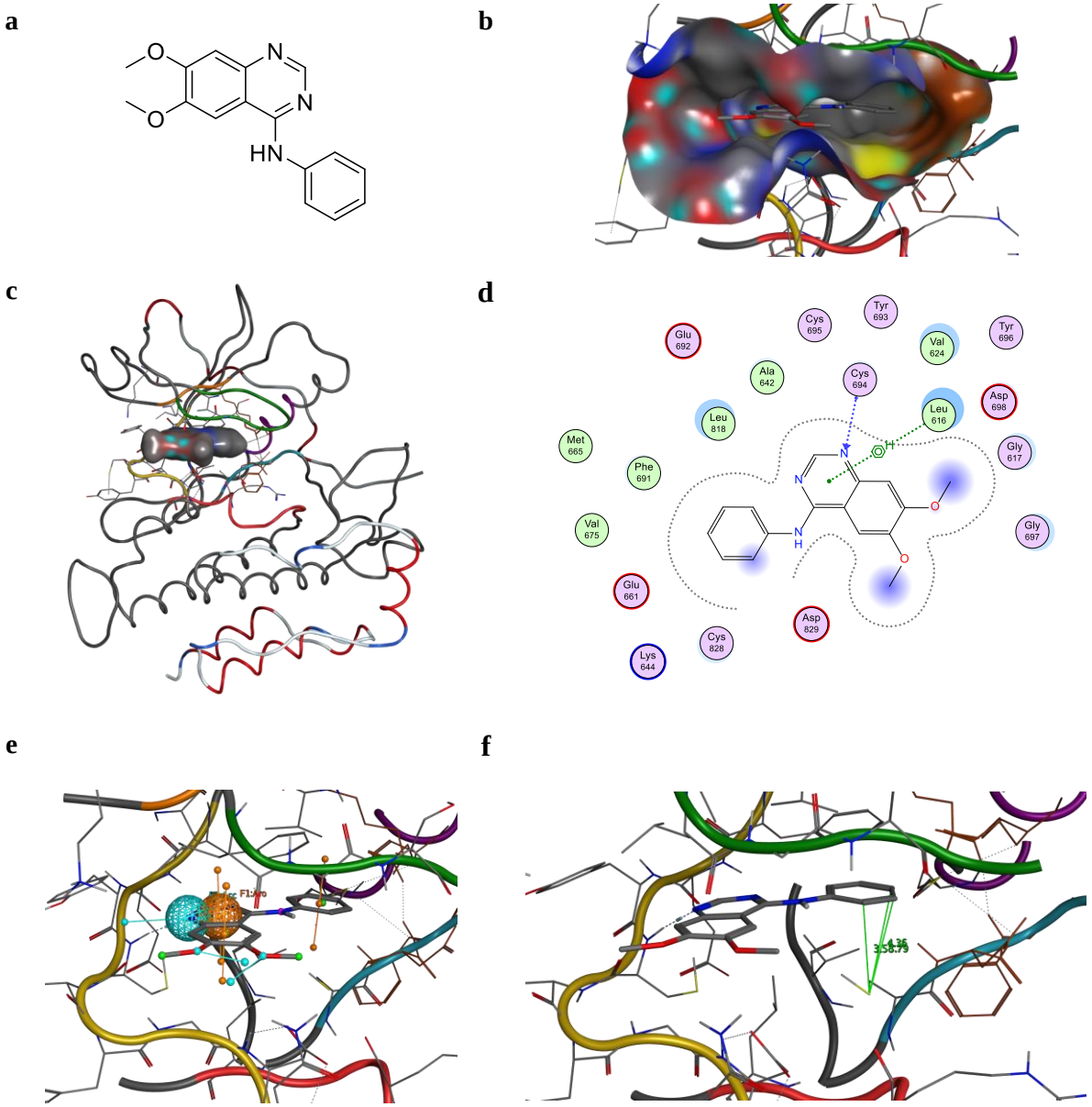


Abbildung 96. (a) Struktur des Grundgerüsts 8. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys[828].

Grundgerüst 9: *N*-(2-Oxo-5-(pyrimidin-4-yl)-1,2-dihydropyridin-3-yl)benzamid

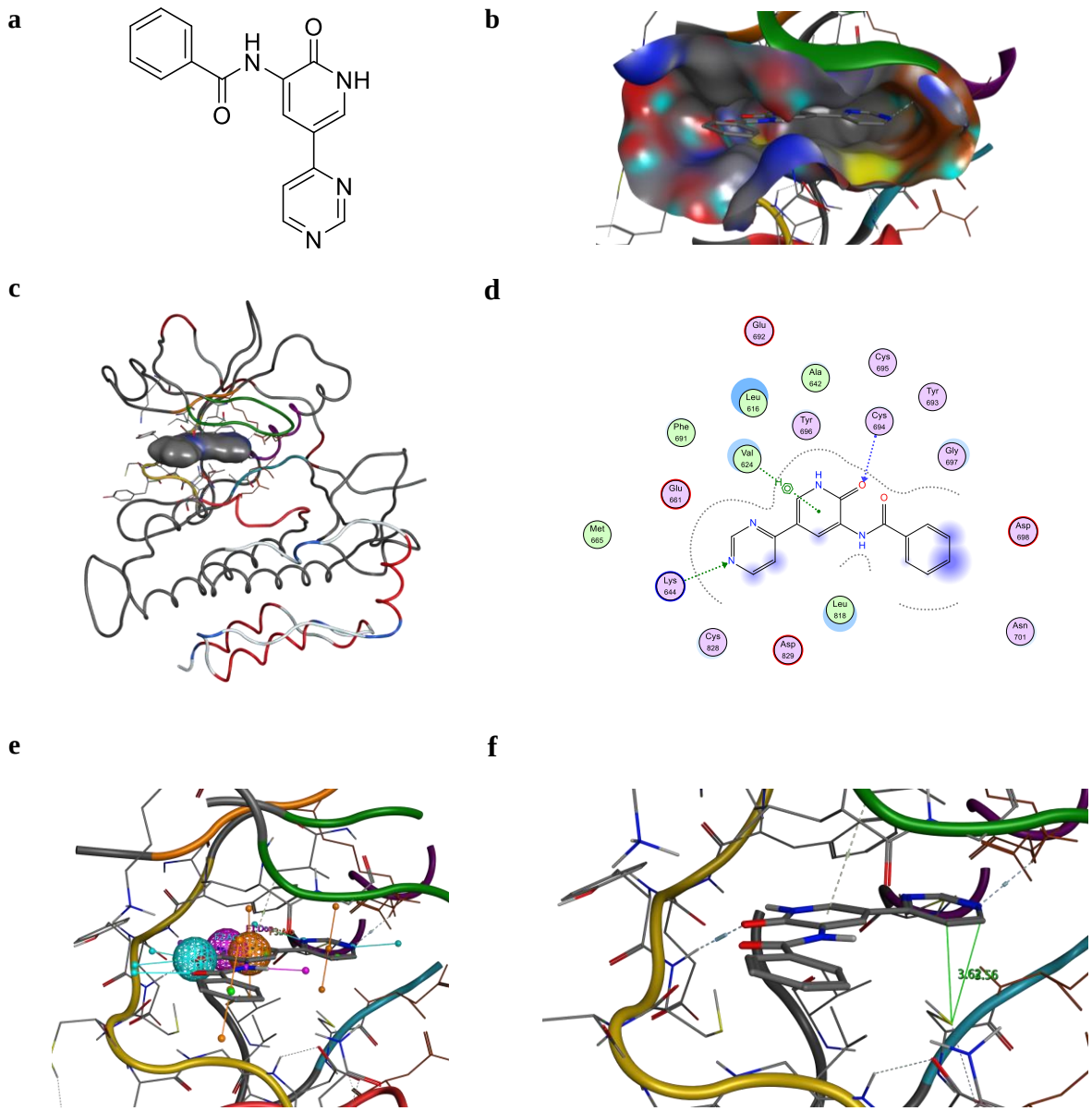


Abbildung 97. (a) Struktur des Grundgerüsts 9. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 10: 3-(1*H*-Benzo[d]imidazol-2-yl)chinolin-2(1*H*)-on

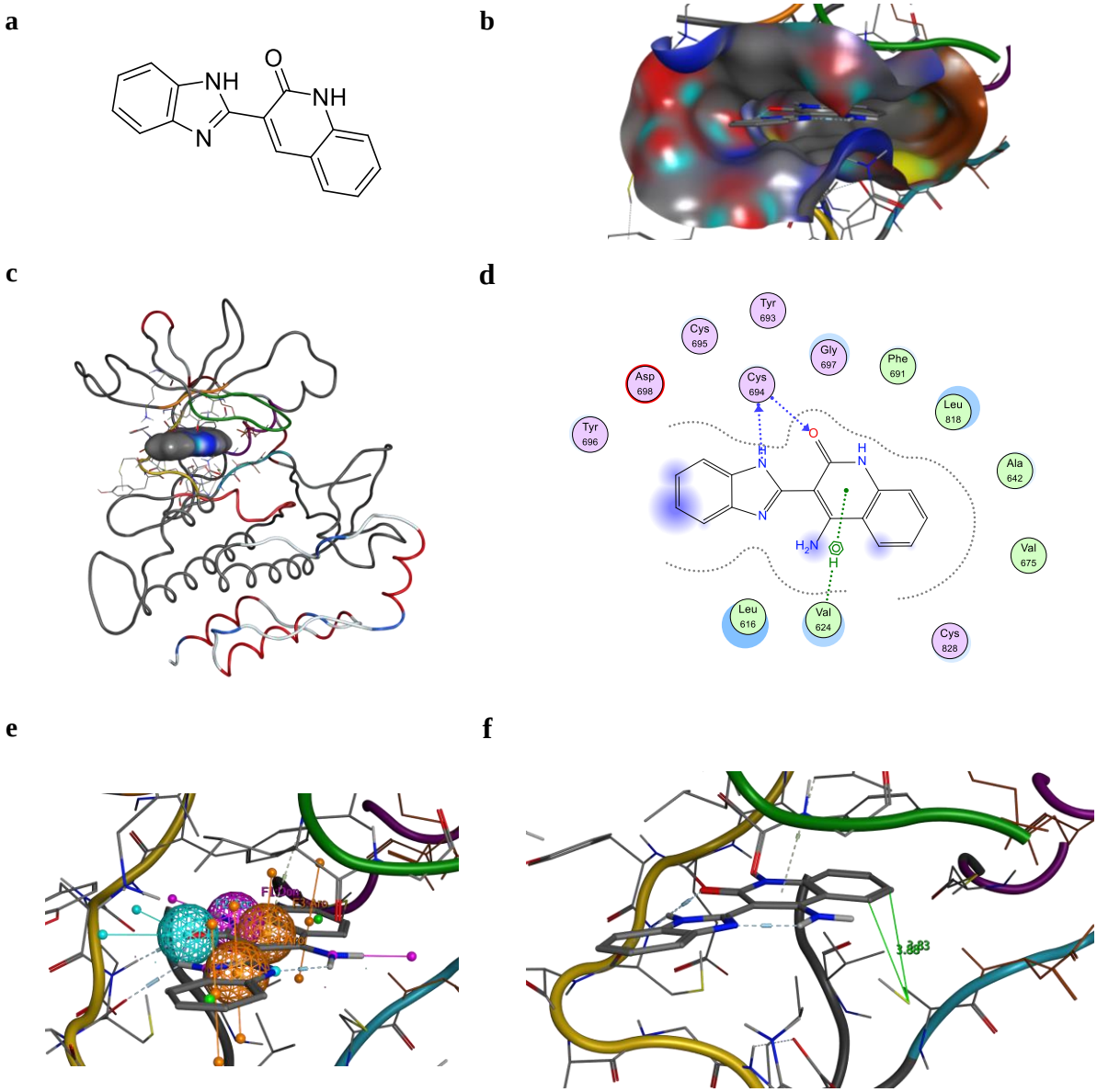


Abbildung 98. (a) Struktur des Grundgerüsts 10. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys[828].

Grundgerüst 11: 3-(4-Methylfuran-2-yl)-4-phenylchinolin-2(1*H*)-on

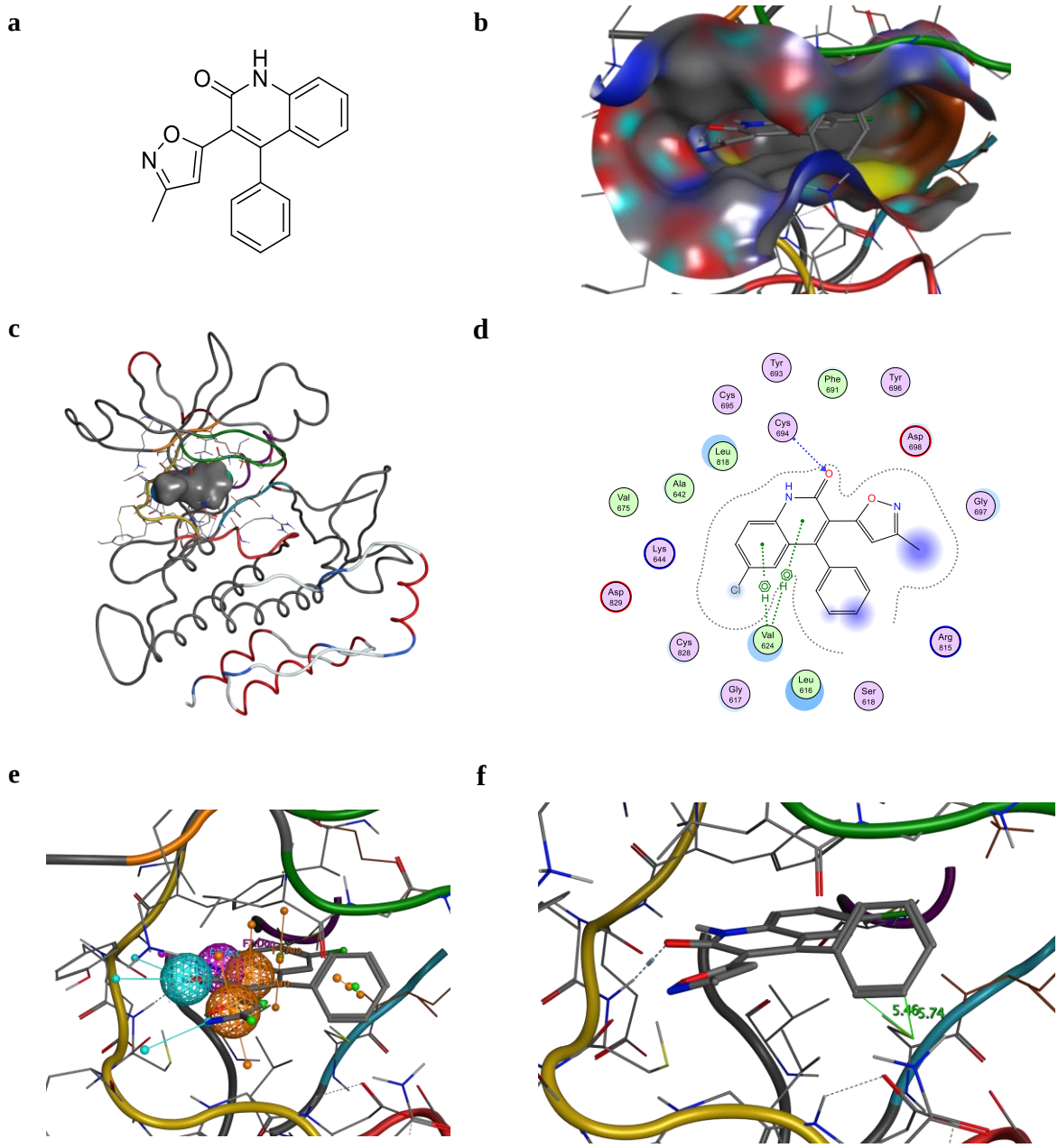


Abbildung 99. (a) Struktur des Grundgerüsts 11. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 12: Di(1*H*-indol-2-yl)methanon

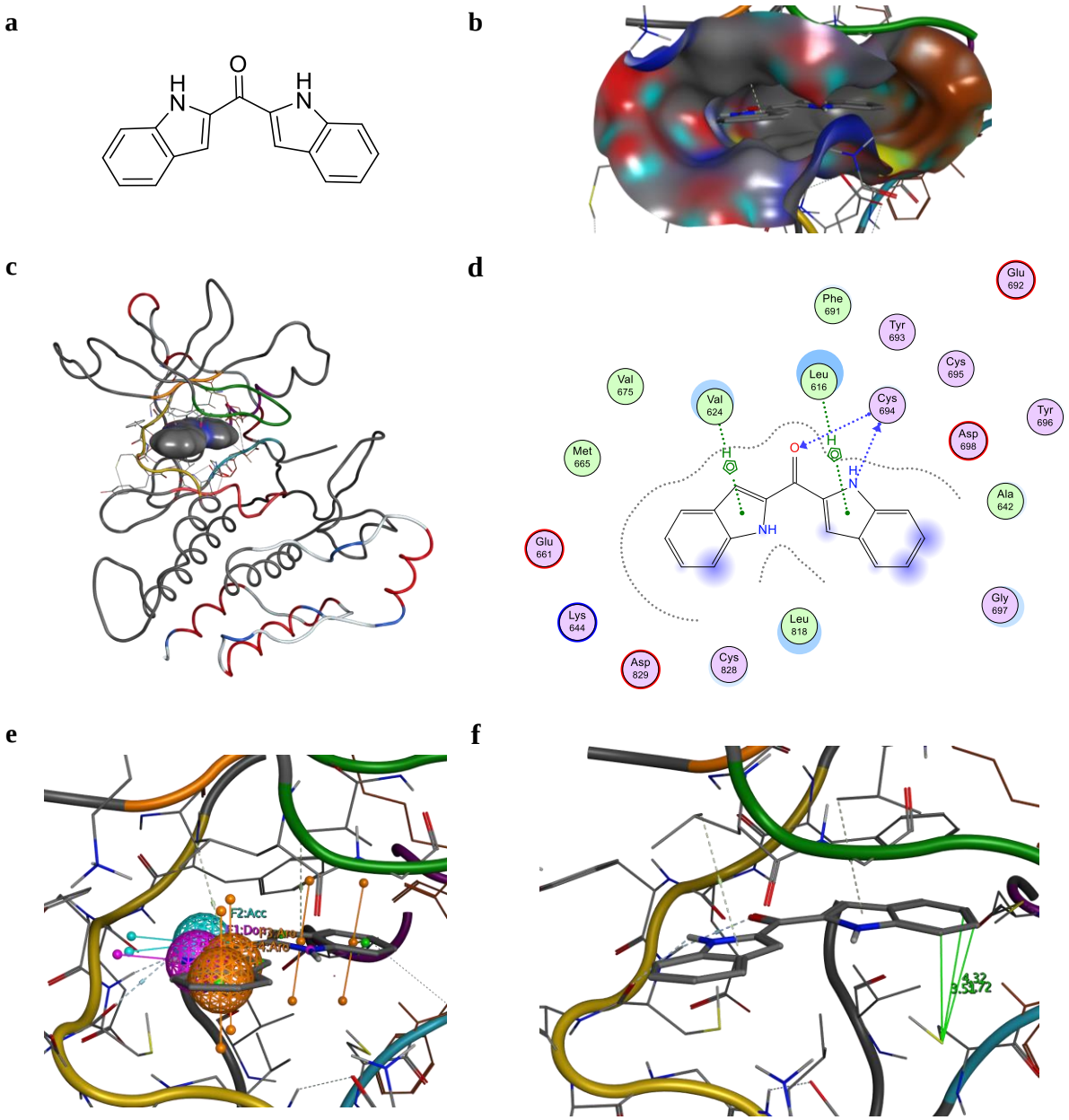


Abbildung 100. (a) Struktur des Grundgerüsts 12. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys^{828}.

Grundgerüst 13: 6,7,12,13-Tetrahydro-5*H*-indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazol-5-on

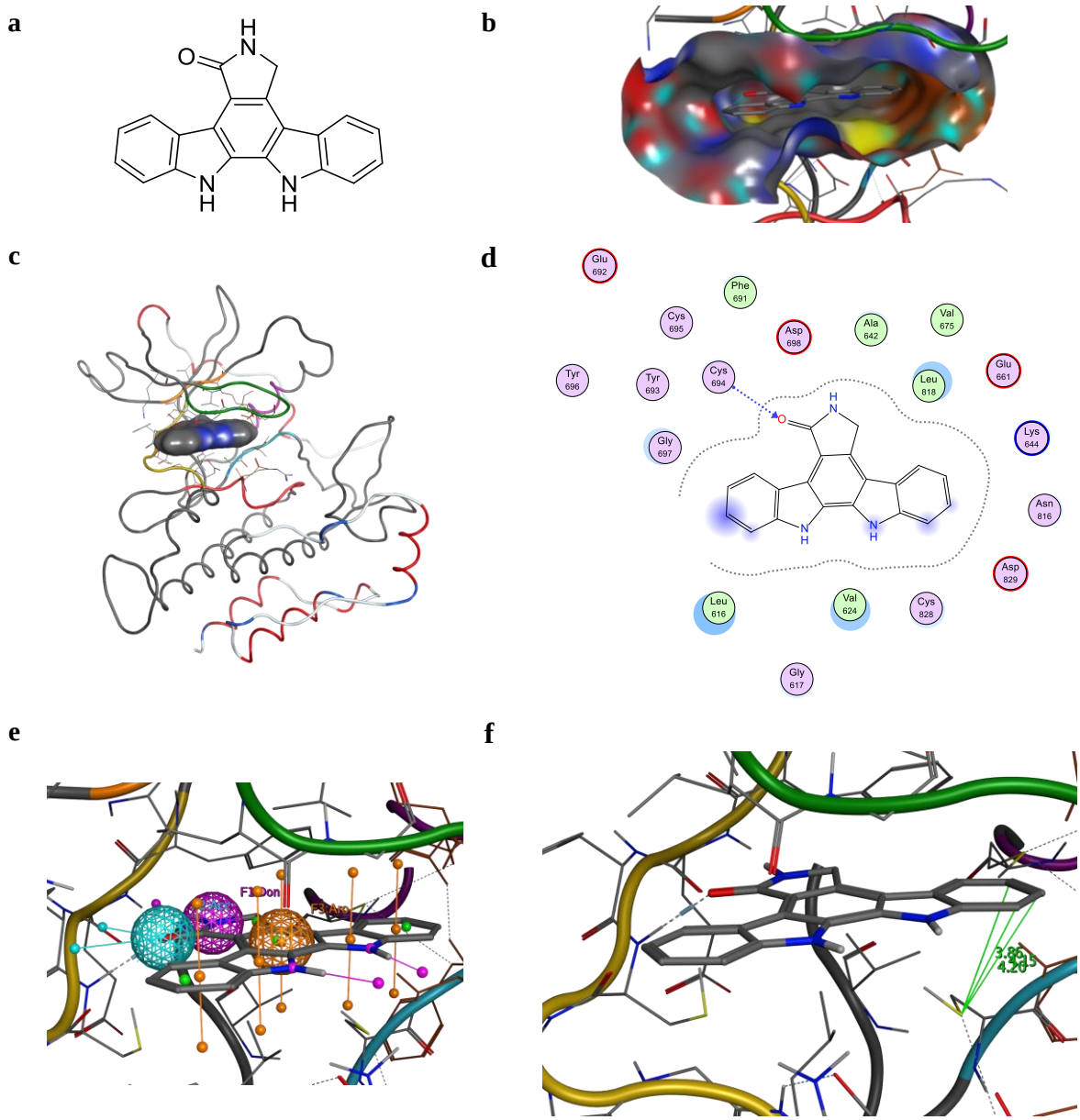


Abbildung 101. (a) Struktur des Grundgerüsts 13. (b) Reversible *Docking*-Position in FLT3. (c) Oberfläche des Liganden in der ATP-Bindetasche. (d) Liganden-Interaktionen. (e) Pharmakophormodell für das virtuelle *Screening*. (f) Abstand ausgewählter Positionen zu Cys[828].

5.1.2.3 Detaillierte Ergebnisse des virtuellen *Screening*

Tabelle 13. Übersicht der Rangfolge der Derivate im kovalenten *Docking*.

Rangfolge des Derivats					
		α-Haloacetamid	Acrylamid	Vinylsulfonamid	Propargylamid
Grundgerüst	Substitution				
1	2	26-64-79-98		69-100	
1	3			46-89	75
2	5				
2	6				
2	8	52-90		71	77
3	2	72			87
3	3	88	99	51-96	10-45
3	4	2-33-42-63-74	49-101	17-54-83	
4	2				
4	3				
5	2	11-14-18-32	48-66	24-29-37-80	21-76
5	3		25	20-36	
5	4			28-57	
6	4		44	43-65-84-86-95	
6	5		1	6-16-22-41-67	
7	2	5-9	7-50-63-73	40	
7	3	3-35	15	31-61	13-19
8	2	38-39-60	56	55-59	
8	3			34-70-81-85	91
8	4	8-30		47	
9	5	53-58-93-97			
9	6			78	
10	5			94	
10	6		92	4	
11	5			102	
11	6			62	
12	4		23-68		
12	5			12-27	
12	6				
13	9				
13	10				
13	11				

Tabelle 14. Übersicht der Anzahl der Derivate im kovalenten *Docking*.

		Anzahl der Hits				
Grundgerüst	**Substitution**	**α-Haloacetamid**	**Acrylamid**	**Vinylsulfonamid**	**Propionamid**	**Summe**
1	**2**	4	0	2	0	6
1	**3**	0	0	2	1	3
2	**5**	0	0	0	0	0
2	**6**	0	0	0	0	0
2	**8**	2	0	1	1	4
3	**2**	1	0	0	1	2
3	**3**	1	1	2	2	6
3	**4**	5	2	3	0	10
4	**2**	0	0	0	0	0
4	**3**	0	0	0	0	0
5	**2**	4	2	4	2	12
5	**3**	0	1	2	0	3
5	**4**	0	0	2	0	2
6	**4**	0	1	5	0	6
6	**5**	0	1	5	0	6
7	**2**	2	4	1	0	7
7	**3**	2	1	2	2	7
8	**2**	3	1	2	0	6
8	**3**	0	0	4	1	5
8	**4**	2	0	1	0	3
9	**5**	4	0	0	0	4
9	**6**	0	0	1	0	1
10	**5**	0	0	1	0	1
10	**6**	0	1	1	0	2
11	**5**	0	0	1	0	1
11	**6**	0	0	1	0	1
12	**4**	0	2	0	0	2
12	**5**	0	0	2	0	2
12	**6**	0	0	0	0	0
13	**9**	0	0	0	0	0
13	**10**	0	0	0	0	0
13	**11**	0	0	0	0	0
Summe		**30**	**17**	**45**	**10**	**102**

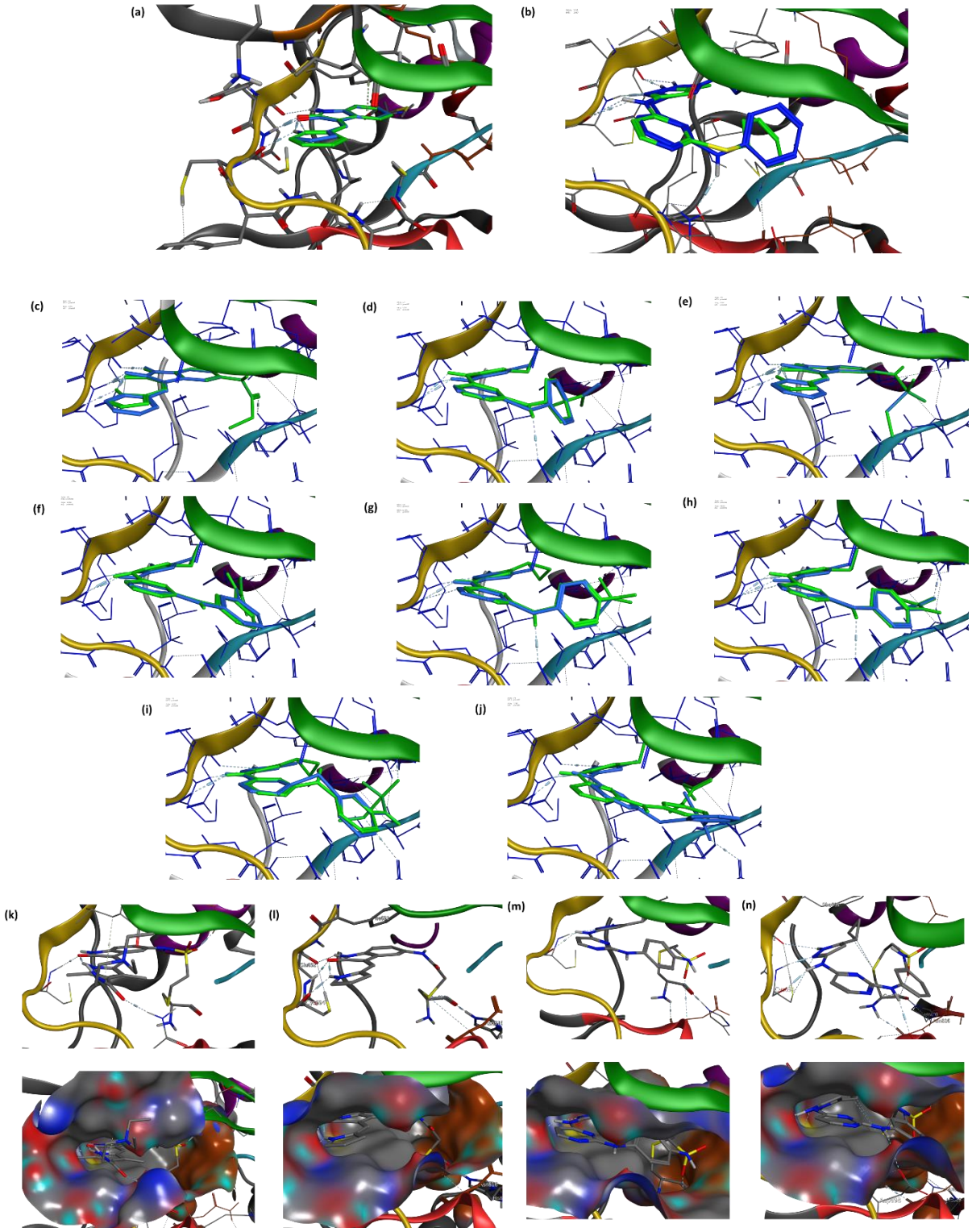


Abbildung 102. Übersicht der *Docking*-Positionen möglicher kovalenter FLT3-Inhibitoren. (a) *Docking* der reversiblen Indolinone **BSc5229** und **BSc5230** und (b) der reversiblen Bisaminopyrimidine **BSc5224** und **BSc5231**. (c - j) Energieminimierte Positionen der ursprünglichen *Screening*-Treffer (blau) und nach Modifikation (grün) des Phenyl- zum Pyrrol-Grundgerüsts (Grundgerüst 6) und Methyl- zu Cyclopropyl-Substitution und Thioether zur Bisarylamin-Verknüpfung (Grundgerüst 3). (c) Grundgerüst 6, Acrylamid, Rang 1. (d) Grundgerüst 6, α-Haloacetamid. (e) Grundgerüst 3, Vinylsulfonamid, Rang 6. (f) Grundgerüst 6, Propargylamid, Rang 10. (g) Grundgerüst 3, Vinylsulfonamid, Rang 17. (h) Grundgerüst 3, α-Haloacetamid, Rang 33. (i) Grundgerüst 3 Vinylsulfonamid, Rang 51. (j) Grundgerüst 3, Acrylamid, Rang 72. (k – n): *Redocking* von (i) BSc5371, (j) **BSc5237**, (k) **BSc5312**, (l) **BSc5311**.

5.1.3 Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren

5.1.3.1 Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren

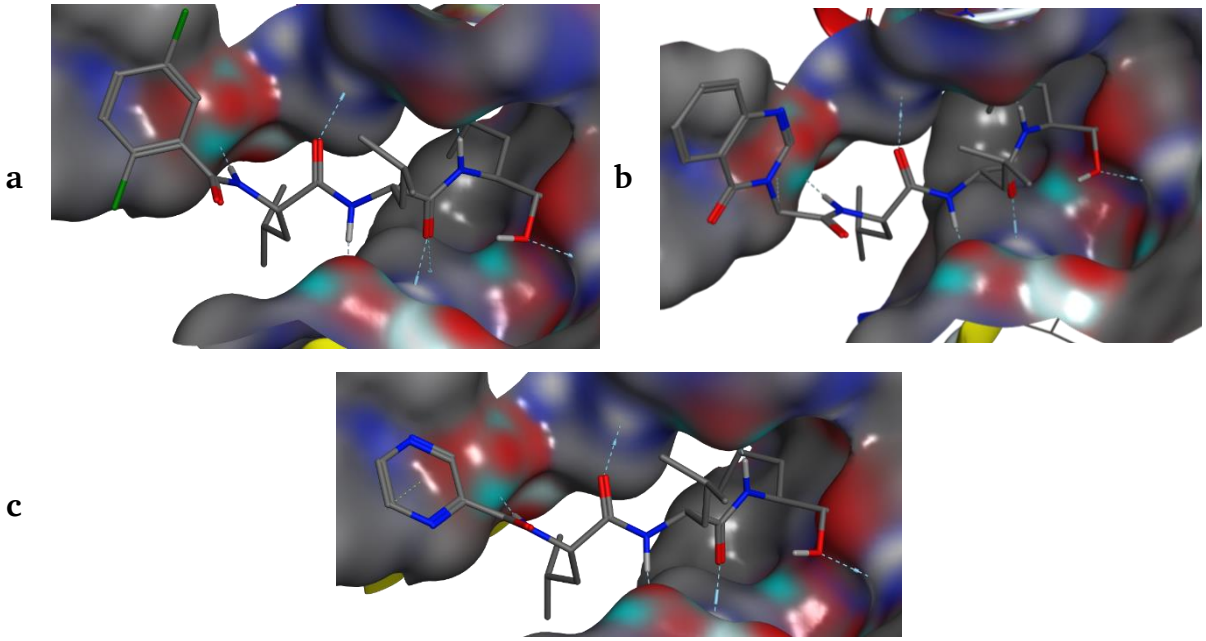
Die molekular Modellierung in diesem Kapitel wurde mit der Software *Molecular Operating Environment* (MOE, Version 2016.0802, Chemical Computing Group) durchgeführt. **BSc4999** in Komplex mit dem yCP wurde von der Protein Data Bank (PDB: 4r02) bezogen und die β6 -(Kette L), β5- (Kette K) und β4-Untereinheiten (Kette J) mit den zugehörigen Liganden und Solvens isoliert und mit der QuickPrep-Funktion ohne *Refinement* der Struktur vorbereitet. Derivatisierung der Cbz-Schutzgruppe und Einführung der ortho-, meta- und para-Phenylether-Gruppe erfolgt ausgehend von der kokristallisierten Struktur von **BSc4999** und werden in der β5-Tasche in ihrer Energie minimiert (Amber12:EHT-Kraftfeld). Die so erhaltenen Konformationen der Aldehyde **BSc5372**, **BSc5373** und **BSc5374** sind in Abbildung 97 dargestellt, die Konformationen der ortho-, meta- und para-Phenylether (**BSc5321** – **BSc5323**) in Abbildung 98 – 100.

5.1.3.2 Strukturbasiertes Design von kovalent bindenden Proteasom-Inhibitoren

Die Leitstruktur **BSc5376** und die Ausgangsverbindung **BSc4999** wurde mit dem DOCKTITE-Skript in MOE kovalent modelliert. Dazu wird im ersten Schritt eine stochastische Konformations-Suche durchgeführt, um Konformationen zu generieren, die wiederum als Startkonformation für die Platzierung vor dem *Docking*-Schritt verwendet werden (*Rejection limit* 100, *RMS gradient* 0.001, *Iteration Limit* 1 x 10^6, MM *iteration limit* 500). Die Drehung um Amid-Bindungen wird dabei nicht erlaubt und das RMSD-Limit, bei dem zwei Konformationen als gleich gelten, auf 0.15 Å gesetzt. Die elektrophile Gruppe wird dann markiert und mit der nukleophilen Thr1-Seitenkette verknüpft. Das so generierte Pharmakophormodell von Thr1 wird dabei automatisch erstellt (d = 0.4 Å, 7 Atome). Thr1 und das benachbarte Amin an Thr2 werden aus der Struktur entfernt um einen sterischen Konflikt nach Einpassung der Thr1-verknüpften Inhibitoren zu verhindern. Das Pharmakophor wird dann um 3 Eigenschaften erweitert, die durch die Konformation von **BSc4999** definiert sind. Dazu gehören ein aromatisches Pharmakophor der Phenylamid-Gruppe und die Donor- und Akzeptor-Eigenschaften der Amid-Gruppe zwischen P2 und P3 (alle d = 2.0 Å). Das *Docking* wird mit der

Pharmakophor Platzierungsmethode durchgeführt, wobei bis zu 5000 Konformationen je Startkonformation erzeugt werden und durch das Pharmakophormodell gefiltert werden. Dann werden bis zu 100 der höchstplatzierten (London dG *Score*) *Docking*-Positionen mit dem Amber12:EHT Kraftfeld (*force constant* 1x 10^9) verfeinert und mit der GBVI/WSA dG Bewertungsfunktion erneut bewertet. Die so erhaltenen Positionen werden vom nukleophilen Thr1-Rest getrennt und diese Struktur mit DSX und dem ursprünglichen Rezeptor mit der DSX-Funktion neu bewertet.

Abbildung 103. Energie-minimierte Positionen von (a) **BSc5373**, (b) **BSc5372** und (c) **BSc5374** in der β5-Untereinheit des yCP.



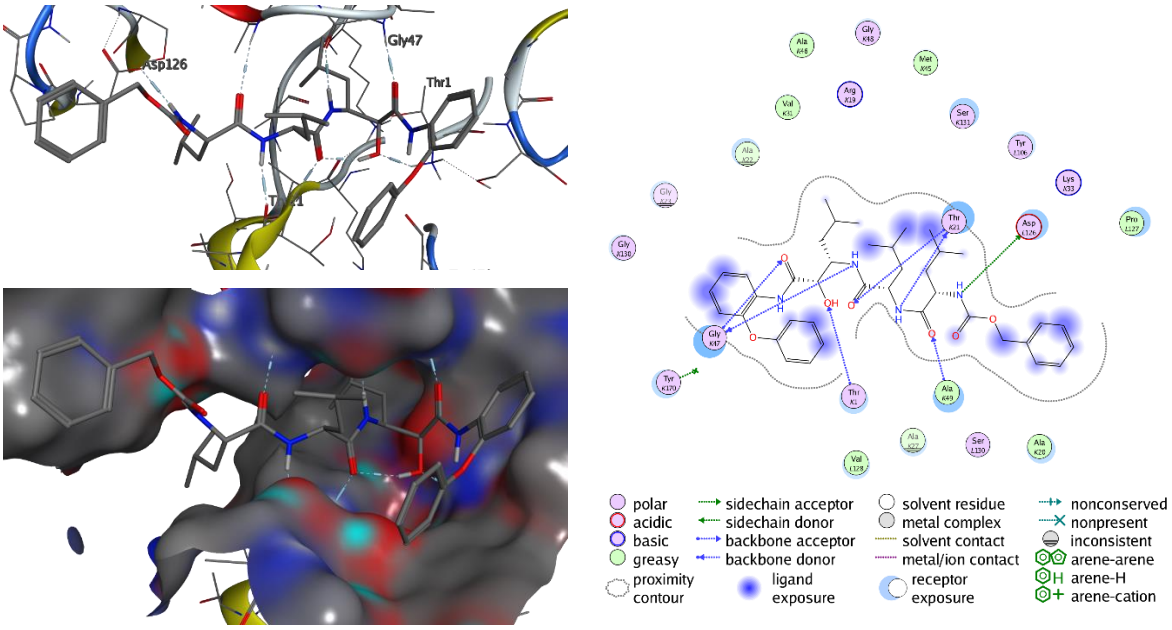


Abbildung 104. Energie-minimierte Position von **BSc5321** in der β5-Untereinheit des yCP und Liganden-Interaktionen.

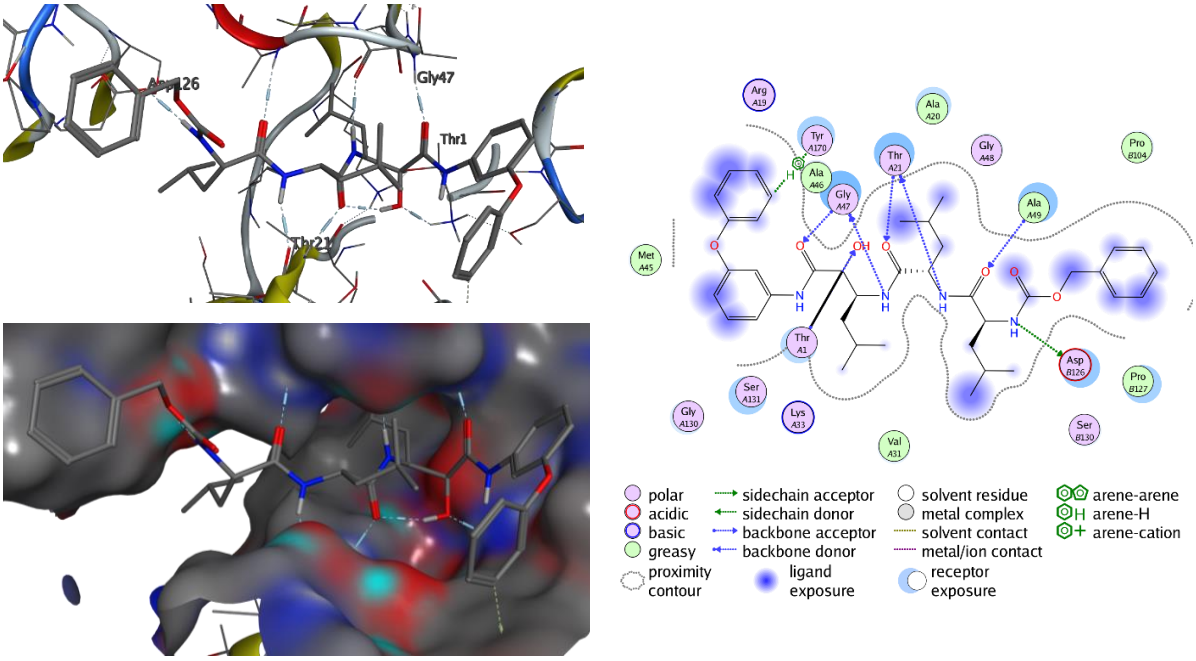


Abbildung 105. Energie-minimierte Position von **BSc5322** in der β5-Untereinheit des yCP und Liganden-Interaktionen.

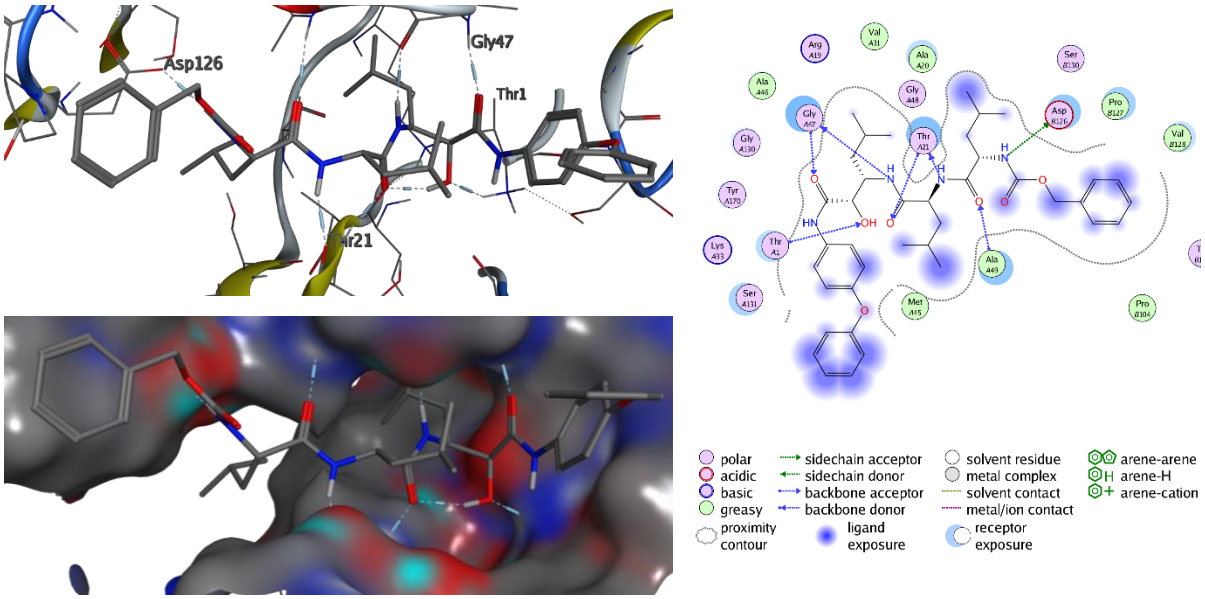


Abbildung 106. Energie-minimierte Position von **BSc5323** in der β5-Untereinheit des yCP und Liganden-Interaktionen.

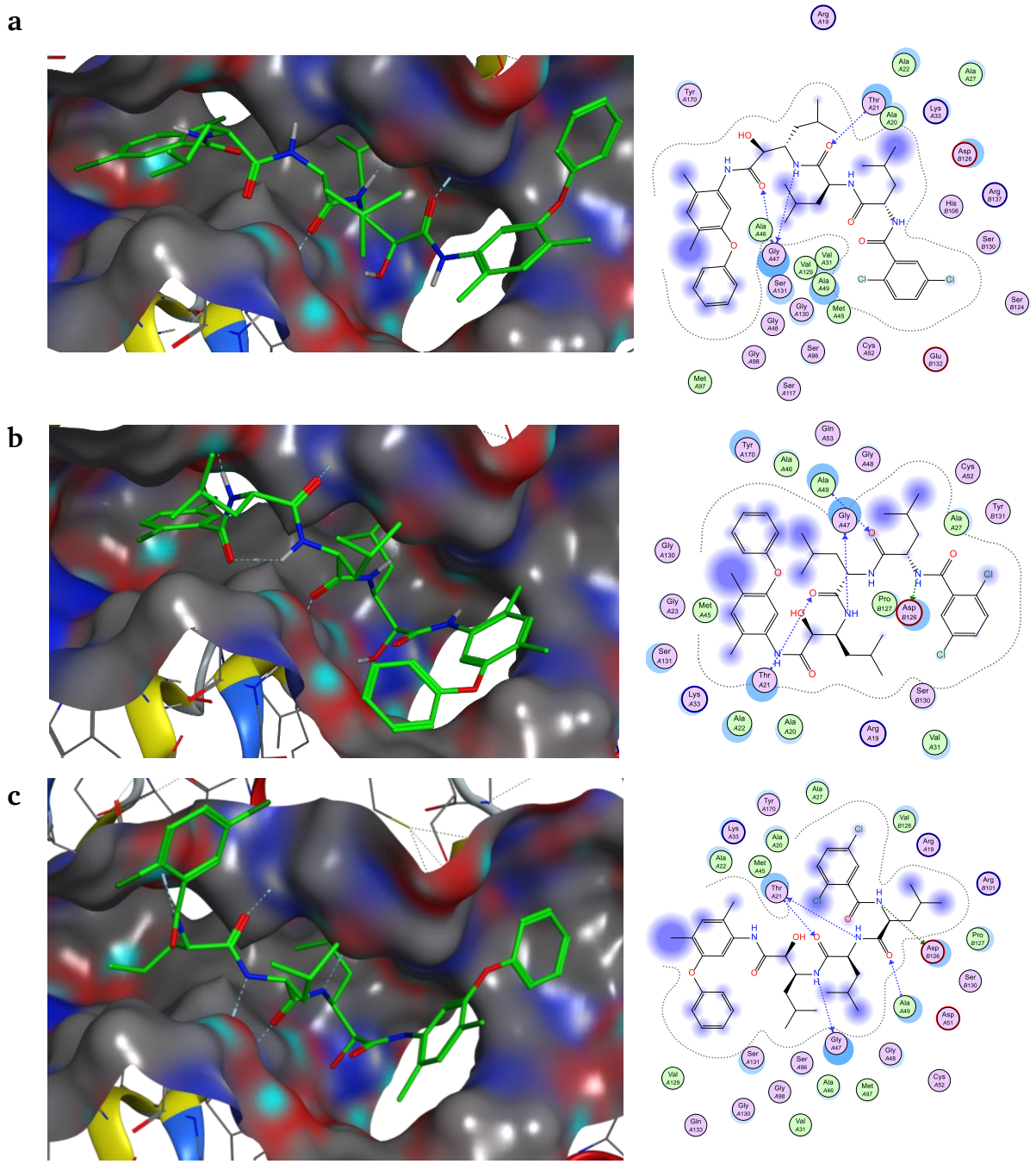


Abbildung 107. Übersicht der Ergebnisse des kovalenten *de novo Docking* von BSc5376. *Docking*-Positionen in (a) Ensemble 1; (b) Ensemble 2 – Gruppe 1; (c) Ensemble 2 – Gruppe 2.

5.2 Organische Synthese

5.2.1 Allgemeine Anmerkungen

5.2.1.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Lösungsmittel und Chemikalien wurden von ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, Deutero Gmbh, Fluka, Grüssing Gmbh, Merck, Carl Roth, Sigma-Aldrich, Carbolution Chemicals und VWR bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Reaktionen unter Schutzgas wurden unter Argon der Qualität 5.0 durchgeführt.

5.2.1.2 Säulen- und Dünnschichtchromatographie

Qualitative analytische Dünnschichtchromatografie wurde mit Kieselgel-60 Platten mit F254 Fluoreszenzindikator durchgeführt. Die entwickelten Platten wurden getrocknet und unter UV-Licht (254 oder 365 nm) ausgewertet. Säulenchromatografie wurde mit Kieselgel-60 (0.015 – 0.04 mm Partikelgröße) von Merck und isokratischen Laufmittel-Gradienten durchgeführt, die Gradienten sind in den Vorschriften angegeben. Flash Chromatografie wurde mit einem Teledyne ISCO Combiflash R_f 4x-System mit vorgepackten Kieselgelsäulen von Telos durchgeführt. Die Säule wurde mit der Zusammensetzung des Laufmittelgemisch bei Beginn der Trennung konditioniert. Signale werden bei 214 nm und 254 nm (*reversed phase*) oder 254nm und 280 nm (*normal phase*) detektiert.

5.2.1.3 NMR- und MS-Spektroskopie

^{1}H und ^{13}C NMR Spektren wurden mit einem Bruker AR 300 (^{1}H bei 300 MHz, ^{13}C bei 75 MHz) oder einem Bruker DRX 500 Spektrometer (^{1}H bei 500 MHz, ^{13}C bei 126 MHz) aufgenommen. Die spezifische Frequenz und das jeweilige Lösungsmittel sind bei jedem Experiment angegeben. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben und ist auf das Solvens-Restsignal referenziert. Die Aufspaltungsmuster sind als Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q) oder Multiplett (m) oder eine Kombination daraus angegeben. Die Kopplungskonstanten J werden auf eine Dezimalstelle gerundet und in

Hz angegeben. Die Spektren wurden mit der Software Mestrenova 11 (Mestrelab) ausgewertet. EI-MS Spektren wurden mit einem MAT96 Massenspektrometer gemessen. ESI-MS Spektren wurden mit einem Bruker Daltonics qTOF Spektrometer gemessen.

5.2.1.4 HPLC-Analytik

Die Hochleistungs Flüssigkeitschromatografie wurde mit einem Agilent 1100 System und einer Phenomenex Synergi Polar reversed phase Säule (4 μm Partikelgröße, 150 x 3.0 mm, Porengröße 80 Å) durchgeführt, die an einen Detektor mit variabler Wellenlänge angeschlossen ist. Die mobile Phase besteht aus einem linearen Gradienten aus Wasser/Acetonitril +0.1 % Trifluoressigsäure, der bei 30% Acetonitril startet (1 min), über 10 min auf 90% Acetonitril ansteigt, und für 1 min gehalten wird, wobei der Durchfluss 1 ml/min beträgt. Die Detektion erfolgt bei 205 nm, 254 nm oder 360 nm.

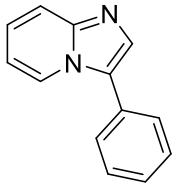
5.2.1.5 Mikrowellen-gestützte Synthese

Die mikrowellen-gestützte Synthese wurde mit einem Biotage *Initiator* Plus Mikrowellenreaktor durchgeführt unter den Bedingungen, die bei den jeweiligen Experimenten angegeben sind.

Alle Substanzen, die in einem biochemischen Assay verwendet werden, haben eine HPLC-Reinheit von mindestens 95% (siehe Kapitel 5.2.4).

5.2.2 Synthese reversibler FLT3-Inhibitoren

5.2.2.1 Synthese von Imidazo[1,2-a]pyridin (BSc5221)



Zu einer Lösung von Imidazo[1,2-a]pyridin (100 mg, 0.846 mmol, 1.0 Äq.) und Brombenzol (251 mg, 1.69 mmol, 2.0 Äq.) in trockenem DMF (4 ml) werden Palladium(II)acetat (19 mg, 0.085 mmol, 0.1 Äq.) und Kaliumacetat (166 mg, 1.69 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und es wird 30 min Argon durch die Lösung geleitet. Das Reaktionsgemisch wird in einem Mikrowellenreaktor bei 160°C für 60 min gerührt. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und zu einer Mischung aus ges. $NaHCO_3$ Lösung (10 ml) und Ethylacetat (20 ml) gegeben. Die organische Phase wurde mit ges. wässr. $NaHCO_3$-Lösung (2 x 10 ml) und Wasser (3 x 10 ml) gewaschen, mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mit *reversed-phase* Flash Chromatographie (Acetonitril/Wasser = 10% bis 100%) gereinigt und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

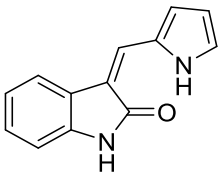
Ausbeute: 95 mg, 0.49 mmol, 58%.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ + 10% DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 8.41 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.77 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.59 – 7.46 (m, 5H), 7.29 (t, J = 6.9 Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$ + 10% DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 140.3, 132.5, 130.8, 129.9, 129.1, 127.3, 124.9, 124.6, 121.0, 117.3, 114.2, 77.4, 77.1, 76.9.

MS (EI): m/z = 194 $[M]^+$.

5.2.2.2 Synthese von (*Z*)-3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)indolin-2-on (BSc5229)



Zu einer Lösung aus 2-Oxindol (200 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.) und 1*H*-Pyrrol-2-carbaldehyd (142 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.) in THF (4 ml) wird Piperidin (25 μl) zugefügt und bei 120°C für 90 min im Mikrowellenreaktor gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mit Flash Chromatografie (MeOH/DCM = 0% bis 10%) gereinigt, wobei das gewünschte Produkt als gelber Feststoff erhalten wird.

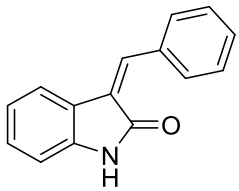
Ausbeute: 131 mg, 0.62 mmol, 42%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.34 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.66 – 7.60 (m, 1H), 7.35 (td, J = 2.7, 1.4 Hz, 1H), 7.15 (td, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.00 (td, J = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 6.89 (dt, J = 7.6, 0.9 Hz, 1H), 6.84 (dt, J = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 6.36 (dt, J = 3.7, 2.3 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.2, 138.9, 129.5, 126.8, 126.3, 125.6, 125.1, 121.2, 120.2, 118.5, 116.8, 111.4, 109.5.

MS (EI): m/z = 210 $[M]^+$.

5.2.2.3 Synthese von (*Z*)-3-Benzylidenindolin-2-on (BSc5230)



Zu einer Lösung aus 2-Oxindol (200 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.) und Benzaldehyd (159 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.) in THF (4 ml) wird Piperidin (25 μl) zugefügt und bei 120°C für 90 min im Mikrowellenreaktor gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mit Flash Chromatografie (MeOH/DCM = 0% bis 10%) gereinigt, wobei das gewünschte Produkt als gelber Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 122 mg, 0.55 mmol, 37%.

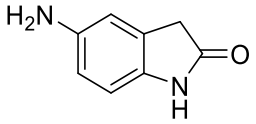
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 10.61 (s, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 2H), 7.66 (s, 1H), 7.60 – 7.45 (m, 4H), 7.25 (td, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 6.95 – 6.78 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 168.6, 143.0, 135.7, 134.5, 130.2, 129.6, 129.2, 128.7, 127.7, 122.3, 121.1, 120.9, 110.1.

MS (ESI): m/z = 244.08 $[M+Na]^+$.

5.2.3 Synthese von 5-substituierten Indolinon-Derivaten

5.2.3.1 Synthese von 5-Aminoindolin-2-on (1)



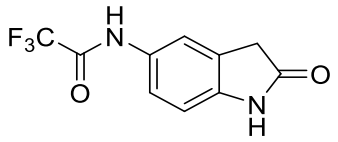
Zu einer Suspension von 5-Nitro-2-oxindol (251 mg, 1.41 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (50 ml) wird Palladium (10%) auf Aktivkohle zugegeben und Wasserstoff für 10 min durch die Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter einer Wasserstoff-Atmosphäre für 18 h gerührt und das Reaktionsgemisch über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten, der ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet wird.

Ausbeute: 200 mg, 1.35 mmol, 96%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 9.91 (s, 1H), 6.49 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.37 (dd, J = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.31 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 175.8, 143.3, 133.4, 126.5, 112.2, 111.5, 109.3, 40.3, 40.0, 39.8, 39.5, 39.2, 38.9, 38.6, 36.1.

5.2.3.2 Synthese von 2,2,2-Trifluoro-*N*-(2-oxoindolin-5-yl)acetamid (2)



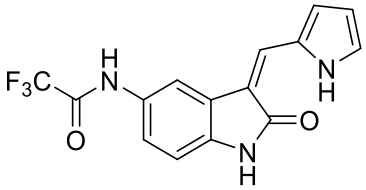
Zu einer Lösung von 5-Aminoindolin-2-on **1** (200 mg, 1.35 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (6 ml) wird Pyridin (218 μl, 2.7 mmol, 2.0 Äq.) und Trifluoressigsäureanhydrid (382 μl, 2.7 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und bei 0°C für 2 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf RT erwärmt und ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (25 ml) und Ethylacetat (50 ml) zugegeben. Die organische Phase wird abgetrennt, mit ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (3 x 30 ml), 0.1 N wässr. HCl (3 x 30 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (30 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt, wobei die Zielverbindung als grauer Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 264 mg, 1.08 mmol, 80%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 11.07 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 7.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.51 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 176.2, 154.3, 154.0, 141.4, 130.0, 126.3, 120.8, 118.1, 109.0, 35.9.

5.2.3.3 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid (3)



Zu einer Lösung aus **2** (244 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) in EtOH (5 ml) wird 1*H*-Pyrrol-2-carbaldehyd (95 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) und Piperidin (20 μl) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 90 min bei 130°C im Mikrowellenreaktor gerührt und auf RT abgekühlt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mit Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Produkt als orangener Feststoff erhalten wird.

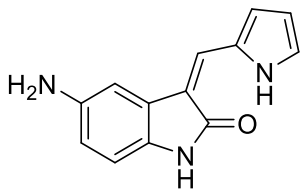
Ausbeute: 120 mg, 0.37 mmol, 37%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.32 (s, 1H), 11.15 (s, 1H), 10.96 (s, 1H), 7.91 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.38 (td, J = 2.6, 1.3 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.96 – 6.89 (m, 2H), 6.37 (dt, J = 3.7, 2.3 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.3, 154.6, 154.2, 136.7, 129.8, 129.5, 126.9, 126.2, 125.4, 121.1, 120.8, 117.9, 116.2, 112.5, 111.6, 109.6.

^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-d_6) δ_F (ppm) = -73.9.

5.2.3.4 Synthese von (*Z*)-3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-5-aminoindolin-2-on (4)



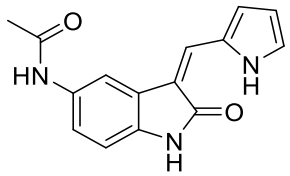
Zu einer Suspension aus **3** (100 mg, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH/Wasser = 2/1 (9 ml) wird Kaliumcarbonat (86 mg, 0.62 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 48 h bei RT gerührt. Wasser (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) werden hinzugefügt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wird mit Wasser (20 ml) und ges. wässr.NaCl-Lsg. (20 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt wobei die Zielverbindung als roter Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 60 mg, 0.27 mmol, 86%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.28 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.13 (q, J = 2.3 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 3.6, 1.8 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 8.1, 2.2 Hz, 1H), 6.16 (q, J = 2.5 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.0, 143.4, 130.0, 129.5, 125.7, 125.0, 124.9, 119.6, 118.1, 113.3, 111.1, 109.9, 104.8.

5.2.3.5 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)acetamid (BSc5232)



Zu einer Lösung aus **4** (100 mg, 0.444 mmol, 1.0 Äq.) in THF (20 ml) bei 0°C wird Triethylamin (123 μl, 0.888 mmol, 2.0 Äq.) und Acetylchlorid (35 μl, 0.488 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Die Lösung wird auf RT erwärmt und für 2 h gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) abgebrochen und die organische Phase mit 0.1 N wässr. HCl (2 x 10 ml) und 0.1 N wässr. NaOH-Lsg. (2 x 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mit Flash Chromatografie (DCM/MeOH = 0% bis 10%) gereinigt, wobei das Produkt als gelber Feststoff isoliert wird.

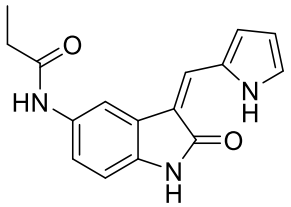
Ausbeute: 69 mg, 0.257 mmol, 58%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.36 (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 7.92 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.37 (dt, J = 4.1, 2.0 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.93 (dt, J = 3.5, 1.7 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.37 (dt, J = 3.6, 2.4 Hz, 1H), 2.05 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.3, 167.8, 134.9, 133.5, 129.5, 126.1, 125.7, 125.1, 120.6, 118.8, 117.0, 111.4, 110.5, 109.4, 23.8.

MS (ESI) m/z = 268.1 $[M+H]^+$.

5.2.3.6 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-propionamid (BSc5236)



Zu einer Lösung aus **4** (57 mg, 0.253 mmol, 1.0 Äq.) in Acetonitril (4 ml) wird Triethylamin (35 μl, 0.253 mmol, 1.0 Äq.), 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (97 mg, 0.51 mmol, 2.0 Äq.) und Propansäure (23 μl, 0.304 mmol, 1.2 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt und Wasser (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) zugegeben. Die organische Phase wird mit ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (20 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

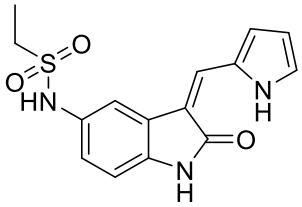
Ausbeute: 21 mg, 0.075 mmol, 30%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.55 – 13.29 (m, 1H), 10.52 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 7.96 – 7.91 (m, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.18 – 7.13 (m, 2H), 6.76 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.72 (dt, J = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 6.30 (dt, J = 3.7, 2.3 Hz, 1H), 2.33 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.15 (t, J = 7.6 Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 171.8, 169.4, 134.9, 133.2, 129.5, 125.5, 125.0, 124.6, 119.7, 118.6, 117.3, 111.1, 110.4, 109.2, 29.5, 9.6.

MS (EI) m/z = 281 $[M]^+$.

5.2.3.7 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-ethanesulfonamid (BSc5235)



Zu einer Lösung von **4** (57 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) in THF (5 ml) bei 0°C wird Diisopropylethylamin (44 μl, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) und Ethansulfonylchlorid (24 μl, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) hinzugefügt, die Lösung langsam auf RT erwärmt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) abgebrochen und die organische Phase mit ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (20 ml) und ges. NaCl-Lsg. (20 ml) gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei die Zielverbindung als gelber Feststoff isoliert wurde.

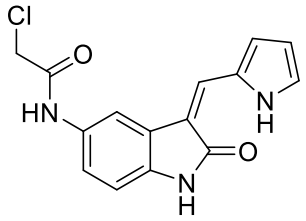
Ausbeute: 18 mg, 0.057 mmol, 23%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6 / $CDCl_3$ = 8/1) δ_H (ppm) = 13.45 (s, 1H), 10.63 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.61 (ddd, J = 11.9, 8.2, 1.4 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.19 (dt, J = 3.8, 1.8 Hz, 1H), 7.01 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.83 – 6.76 (m, 2H), 6.32 (dt, J = 3.7, 2.4 Hz, 1H), 2.99 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 1.29 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6 / $CDCl_3$ = 8/1) δ_C (ppm) = 169.3, 136.1, 131.7, 131.6, 131.4, 131.4, 129.4, 128.3, 128.2, 126.1, 125.8, 124.9, 120.7, 120.2, 116.7, 112.1, 111.3, 109.7, 44.5, 7.8.

MS (EI) m/z = 317 $[M]^+$.

5.2.3.8 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-2-chloracetamide (BSc5237)



Zu einer Lösung aus **4** (106 mg, 0.47 mmol, 1.0 Äq.) in THF (15 ml) bei 0°C wird Pyridin (57 μl, 0.71 mmol, 1.5 Äq.) und 2-Chloracetylchlorid (49 μl, 0.611 mmol, 1.3 Äq.) zugefügt. Die Lösung wird auf RT erwärmt und für 1 h gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) abgebrochen und die organische Phase mit ges. wässr. $NaHCO_3$-LSg. (20 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Produkt als gelber Feststoff erhalten wird.

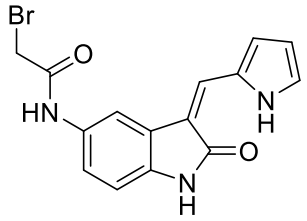
Ausbeute: 53 mg, 0.18 mmol, 37%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.42 (s, 1H), 10.66 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 7.89 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.23 – 7.17 (m, 2H), 6.83 – 6.76 (m, 2H), 6.31 (dt, J = 3.6, 2.3 Hz, 1H), 4.17 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.3, 164.2, 135.5, 132.3, 129.5, 125.9, 125.2, 124.9, 120.1, 118.8, 117.0, 111.2, 110.5, 109.3, 43.3.

MS (ESI) m/z = 302.1 $[M+H]^+$.

5.2.3.9 Synthese von (Z)-N-(3-((1H-pyrrol-2-yl)methylene)-2-oxoindolin-5-yl)-2-bromacetamid (BSc5316)



Zu einer Lösung von **4** (247 mg, 1.1 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (20 ml) bei 0°C wird Diisopropylethylamin (382 μl, 2.2 mmol, 2.0 Äq.) und 2-Bromacetylbromid (242 mg, 1.2 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Die Lösung wird langsam auf RT erwärmt und für 1 h gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (40 ml) abgebrochen und die organische Phase wird mit ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (20 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei die Zielverbindung als gelber Feststoff isoliert wird.

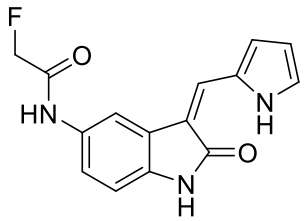
Ausbeute: 163 mg, 0.472 mmol, 47%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.34 (s, 1H), 10.86 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.36 (q, J = 2.1 Hz, 1H), 7.20 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.00 – 6.77 (m, 2H), 6.36 (dt, J = 4.1, 2.3 Hz, 1H), 4.04 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.2, 164.4, 135.4, 132.6, 129.5, 126.4, 125.9, 125.2, 120.8, 118.9, 116.7, 111.5, 110.5, 109.6, 30.4.

MS (ESI) m/z = 346.03 $[M+H]^+$.

5.2.3.10 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-2-fluoracetamid (BSc5315)



BSc5316 (124 mg, 0.355 mmol, 1.0 Äq.) und Kaliumfluorid (206 mg, 3.55 mmol, 10.0 Äq.) werden in Diethylenglykol (5 ml) suspendiert und bei 130°C für 5 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf RT abgekühlt, mit Wasser (100 ml) verdünnt, mit DCM (2 x 50 ml) extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Produkt als gelber Feststoff isoliert wird.

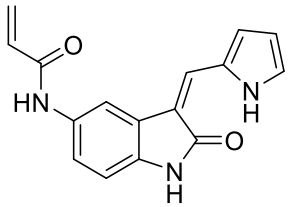
Ausbeute: 35 mg, 0.123 mmol, 35%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6) δ_H (ppm) = 13.34 (s, 1H), 10.86 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.49 – 7.24 (m, 2H), 7.01 – 6.78 (m, 2H), 6.36 (dt, J = 3.8, 2.3 Hz, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.90 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6) δ_C (ppm) = 169.3, 165.6, 165.4, 135.5, 131.9, 129.4, 126.3, 125.8, 125.1, 120.8, 119.7, 116.7, 111.4, 109.4, 81.2, 78.8.

MS (ESI) m/z = 286.1 $[M+H]^+$.

5.2.3.11 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-acrylamid (BSc5233)



Zu einer Lösung aus **4** (153 mg, 0.679 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (25 ml) bei 0°C wird Triethylamin (188 μl, 1.36 mmol, 2.0 Äq.) und Acryloylchlorid (60 μl, 0.75 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Die Lösung wird auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) abgebrochen, die organische Phase mit ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (2 x 20 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Produkt als gelber Feststoff erhalten wird.

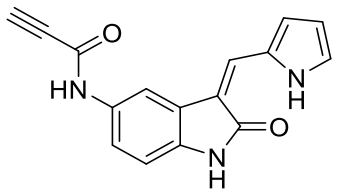
Ausbeute: 65 mg, 0.232 mmol, 34%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.33 (s, 1H), 10.83 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.00 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.45 – 7.24 (m, 2H), 7.02 – 6.80 (m, 2H), 6.45 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.37 – 6.15 (m, 1H), 5.75 (dd, J = 10.1, 2.0 Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.3, 163.0, 135.2, 133.0, 131.9, 129.4, 126.4, 126.3, 125.9, 125.2, 120.8, 119.0, 116.7, 111.5, 110.6, 109.6.

MS (ESI) m/z = 280.5 $[M+H]^+$.

5.2.3.12 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)-propionamid (BSc5238)



Zu einer Lösung aus **4** (115 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq.) in Acetonitril (4 ml) bei 0°C wird Triethylamin (71 μl, 0.51 mmol, 1.0 Äq.), 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (195 mg, 1.02 mmol, 2.0 Äq.) und Propargylsäure (38 μl, 0.612 mmol, 1.2 Äq.) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) abgebrochen und die organische Phase mit 0.1 N wässr. HCl (2 x 10 ml) und 0.1 N wässr. NaOH-Lsg. (2 x 10 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Produkt als gelber Feststoff erhalten wird.

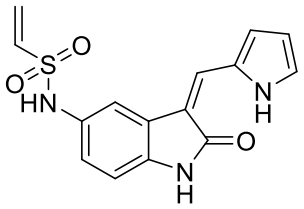
Ausbeute: 61 mg, 0.22 mmol, 43%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.42 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.89 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.33 – 7.19 (m, 2H), 6.86 – 6.75 (m, 2H), 6.32 (dt, J = 3.7, 2.3 Hz, 1H), 4.02 (s, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.3, 149.4, 135.6, 132.2, 129.4, 126.0, 125.1, 125.1, 120.3, 119.0, 111.3, 110.7, 109.3, 75.9.

MS (EI) m/z = 277 $[M]^+$.

5.2.3.13 Synthese von (*Z*)-*N*-(3-((1*H*-Pyrrol-2-yl)methylen)-2-oxoindolin-5-yl)ethensulfonamid (BSc5234)



Zu einer Lösung aus **4** (112 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) in THF (5 ml) wird Diisopropylethylamin (175 μl, 1.0 mmol, 2.0 Äq.) und 2-Chlorethansulfonylchlorid (53 μl, 0.5 mmol, 1.1 Äq.) gegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei RT gerührt und durch Zugabe von ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) abgebrochen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie gereinigt (DCM/MeOH = 20/1), wobei die Zielverbindung als gelber Feststoff isoliert wird.

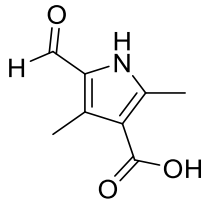
Ausbeute: 57 mg, 0.18 mmol, 36%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.42 (s, 1H), 10.69 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.22 (td, J = 2.6, 1.4 Hz, 1H), 6.96 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 1.9 Hz, 0H), 6.79 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.32 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.04 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 5.90 (d, J = 10.0 Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.3, 136.4, 136.0, 131.0, 129.5, 126.5, 126.3, 126.3, 125.6, 125.1, 121.5, 120.4, 116.6, 113.0, 111.3, 109.6.

MS (EI) m/z = 315 $[M]^+$.

5.2.3.14 Synthese von 5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carbonsäure (5)



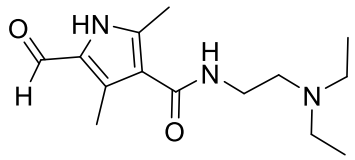
5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carbonsäureethylester (390 mg, 2.0 mmol, 1.0 Äq.) wird in einer Mischung aus Wasser (6 ml) und MeOH (2 ml) suspendiert. Kaliumhydroxid (449 mg, 8.0 mmol, 4.0 Äq.) wird zugegeben und die Lösung bei 70°C für 3 h gerührt, auf RT abgekühlt und zu einer auf 0°C gekühlten Mischung aus 2 N HCl (4 ml) und 0.1 N HCl (5 ml) gegeben. Der ausgefallene Feststoff wird durch Filtration isoliert und im Hochvakuum getrocknet, wobei das Produkt als beiger Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 325 mg, 1.94 mmol, 97%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 11.58 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 176.6, 166.3, 143.2, 134.9, 127.9, 113.3, 13.5, 10.1.

5.2.3.15 Synthese von *N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (6)



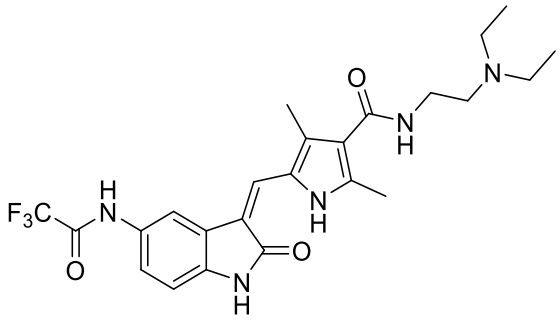
Zu einer Lösung aus 5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*pyrrol-3-carbonsäure (150 mg, 0.9 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (5 ml) wird *N*-Hydroxybenzotriazol Hydrat (172 mg, 1.08 mmol, 1.2 Äq.) und *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (207 mg, 1.08 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und die Suspension 20 min bei RT gerührt. Es wird tropfenweise eine Mischung aus *N*,*N*-Diethylethylendiamin (253 μl, 1.79 mmol, 2.0 Äq.) und Triethylamin (269 μl, 1.79 mmol, 2.0 Äq.) in DMF (1 ml) zugegeben und die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird dann mit Ethylacetat (50 ml) verdünnt und mit 0.1 N wässr. HCl, 0.1 N wässr. NaOH-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. (jeweils 3 x 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt durch Kieselgelchromatografie gereinigt (DCM/MeOH = 20/1), wobei das Produkt als farbloses Öl erhalten wird.

Ausbeute: 191 mg, 0.72 mmol, 80%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 11.94 – 11.74 (m, 1H), 9.54 (s, 1H), 3.32 – 3.18 (m, 2H), 2.61 – 2.48 (m, 6H), 2.38 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 0.98 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 177.2, 164.4, 137.8, 130.5, 127.7, 119.4, 51.5, 46.5, 36.7, 12.5, 11.6, 9.6.

5.2.3.16 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrole-3-carboxamid (7)



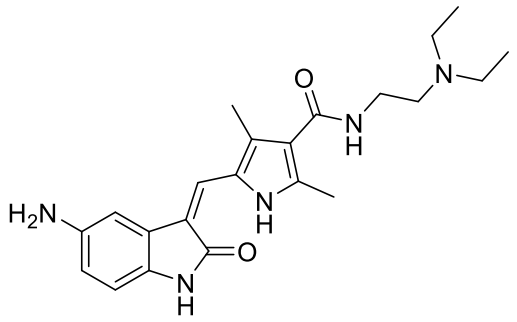
Zu einer Lösung aus *N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (191 mg, 0.72 mmol, 1.0 Äq.) in EtOH (10 ml) wird 2,2,2-Trifluor-*N*-(2-oxoindolin-5-yl)acetamid (175 mg, 0.72 mmol, 1.0 Äq.) und Piperidin (20 μl) gegeben und das Reaktionsgemisch für 90 min bei 130°C im Mikrowellenreaktor gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf RT gekühlt, der Niederschlag isoliert und aus EtOH umkristallisiert, wodurch das Produkt als oranger Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 157 mg, 0.32 mmol, 44%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.64 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 7.94 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.48 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.33 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.67 – 2.56 (m, 6H), 2.47 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.02 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.6, 164.6, 154.7, 154.4, 136.3, 129.7, 129.6, 125.8, 125.7, 123.8, 120.7, 120.6, 117.2, 114.9, 114.5, 113.1, 109.5, 51.5, 46.6, 36.79, 13.3, 11.5, 10.5.

5.2.3.17 Synthese von (*Z*)-5-((5-Amino-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (8)



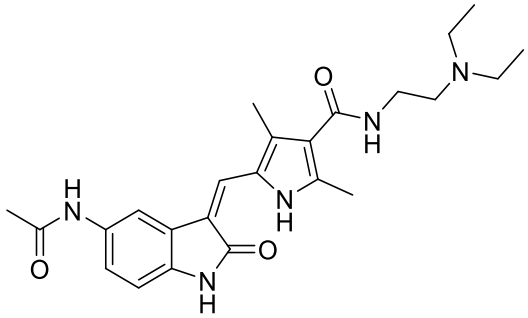
Zu einer Suspension aus (*Z*)-*N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (157 mg, 0.32 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (10 ml) und Wasser (5 ml) wird Kaliumcarbonat (177 mg, 1.28 mmol, 4.0 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 Tage bei RT gerührt. Ethylacetat (30 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (30 ml) werden zugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt, wodurch das Produkt als gelber Feststoff erhalten wird, das ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet werden kann.

Ausbeute: 68 mg, 0.17 mmol, 54%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.72 (s, 1H), 10.46 (s, 1H), 7.38 (s, 2H), 6.97 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.44 (dd, J = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.32 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 2.58 (dd, J = 12.9, 6.5 Hz, 6H), 2.45 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.01 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.2, 164.8, 143.3, 134.9, 129.7, 127.9, 126.0, 125.5, 121.9, 120.0, 116.5, 112.9, 109.8, 104.8, 51.6, 46.5, 36.8, 13.3, 11.7, 10.5.

5.2.3.18 Synthese von (*Z*)-5-((5-Acetamido-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5319)



Zu einer Lösung aus (*Z*)-5-((5-Amino-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (71 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (10 ml) bei 0°C werden Triethylamin (50 μl, 0.36 mmol, 2.0 Äq.) und Acetylchlorid (26 μl, 0.36 mmol, 2.0 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 18 h bei RT gerührt und die Reaktion durch Zugabe von ges. wässr. NaCl-Lsg. (30 ml) und Ethylacetat (30 ml) abgebrochen und mit Ethylacetat (2 x 30 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird über *reversed phase* Flash Chromatografie (Acetonitril/Wasser = 10% bis 100 %) gereinigt, wobei das Produkt als gelber Feststoff erhalten wird.

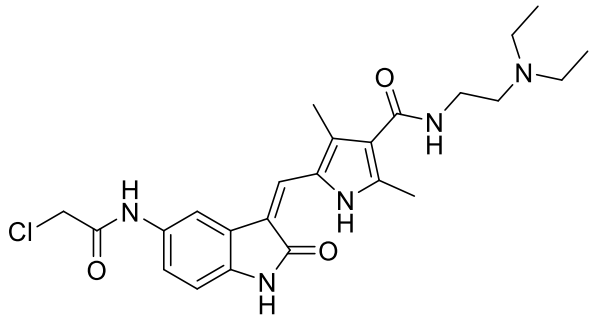
Ausbeute: 48 mg, 0.11 mmol, 61%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.64 (s, 1H), 10.81 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 8.05 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.54 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.27 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.30 – 3.25 (m, 1H), 3.12 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.04 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 171.2, 169.5, 167.8, 164.9, 159.1, 157.7, 144.0, 135.9, 134.47, 133.3, 133.0, 129.1, 128.8, 125.5, 125.4, 125.2, 122.8, 120.2, 118.7, 116.5, 115.2, 110.7, 109.3, 33.8, 29.0, 24.0, 23.7, 14.5, 13.3, 10.9, 10.4.

MS (ESI) m/z = 438.3 $[M+H]^+$.

5.2.3.19 Synthese von (*Z*)-5-((5-(2-Chloracetamido)-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5318)



Zu einer Lösung aus (*Z*)-5-((5-Amino-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (37 mg, 0.093 mmol, 1.0 equiv) in trockenem THF (5 ml) bei 0°C werden Diisopropylethylamin (32 μl, 0.186 mmol, 2.0 Äq.) und 2-Chloracetylchlorid (8.9 μl, 0.11 mmol, 1.2 Äq.) gegeben und für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. NaCl-Lsg. (30 ml) und Ethylacetat (30 ml) abgebrochen und mit Ethylacetat (2 x 30 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird über *reversed phase* Flash Chromatografie (Acetonitril/Wasser = 10% bis 100%) wobei die Zielverbindung als gelber Feststoff isoliert wird.

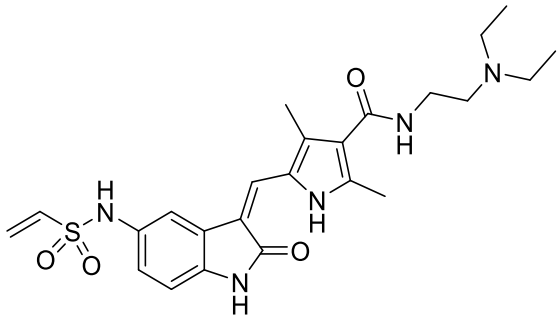
Ausbeute: 17 mg, 0.036 mmol, 39%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.57, 10.79, 10.09, 7.81, 7.42, 7.36, 7.35, 7.34, 7.21, 7.19, 6.79, 6.77, 4.27, 4.17, 3.63, 3.44, 3.23, 3.21, 2.50, 2.49, 2.48, 2.46, 2.45, 2.43, 2.37, 2.35, 2.33, 1.31, 1.17, 0.93, 0.91, 0.90, 0.78, 0.00.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.5, 164.5, 164.3, 135.9, 135.1, 132.3, 129.3, 125.6, 125.6, 123.3, 119.0, 111.1, 109.4, 51.7, 46.5, 43.5, 37.0, 13.3, 11.8, 10.5.

MS (ESI) m/z = 472.2 $[M+H]^+$.

5.2.3.20 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(vinylsulfonamido)indolin-3-yliden)-methyl)-1H-pyrrol-3-carboxamid (BSc5371)



Zu einer Lösung von (*Z*)-5-((5-Amino-2-oxoindolin-3-ylidene)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (68 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (10 ml) bei 0°C wird Triethylamin (46 μl, 0.34 mmol, 2.0 Äq.) und 2-Chlorethansulfonylchlorid (36 μl, 0.34 mmol, 2.0 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei RT gerührt und ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (20 ml) zugegeben und mit Ethylacetat (2 x 20 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird über *reversed phase* Flash Chromatografie (Acetonitril/Wasser = 10% bis 100%) gereinigt und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

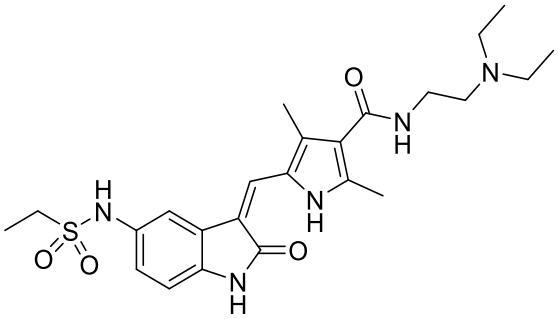
Ausbeute: 34 mg, 0.07 mmol, 41%.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$ / DMSO-d_6 = 8/1) δ_H (ppm) = 13.35 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 7.08 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.71 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.51 (dd, J = 11.5, 7.0 Hz, 2H), 6.31 (dd, J = 16.6, 10.0 Hz, 1H), 5.83 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 5.59 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 3.23 – 3.18 (m, 2H), 2.45 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.41 – 2.35 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 0.79 (d, J = 7.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$ / DMSO-d_6 = 8/1) δ_C (ppm) = 170.0, 165.5, 137.1, 136.20 135.6, 130.8, 128.9, 126.4, 126.3, 126.0, 123.0, 121.6, 119.2, 115.2, 113.2, 109.7, 51.4, 46.4, 36.5, 13.8, 11.3, 11.1.

MS (ESI) m/z = 486.2 $[M+H]^+$.

5.2.3.21 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(Diethylamino)ethyl)-5-((5-(ethylsulfonamido)-2-oxo-indolin-3-yliden)methyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5411)



Zu einer Lösung aus (*Z*)-5-((5-Amino-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(diethylamino)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF wird Pyridin und Ethansulfonylchlorid (24 μl, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. NaCl-Lsg. (20 ml) und Ethylacetat (30 ml) abgebrochen und mit ges. NaCl-Lsg. (5 x 30 ml) gewaschen. Die organische Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch *reversed-phase* Flash Chromatografie (Acetonitril/Wasser = 10% bis 100%) gereinigt und die Zielverbindung als gelber Feststoff erhalten.

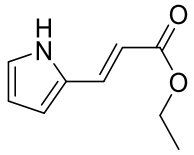
Ausbeute: 39 mg, 0. 08 mmol, 32 %.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ / DMSO- d_6 = 8/1) δ_H (ppm) = 13.37 (s, 1H), 11.27 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.58 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.69 (q, J = 5.7 Hz, 2H), 3.24 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.12 (q, J = 7.4 Hz, 4H), 2.93 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 1.33 – 1.17 (m, 9H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$ / DMSO-d_6 = 8/1) δ_C (ppm) = 167.0, 141.4, 137.6, 136.0, 131.5, 129.8, 126.6, 126.2, 123.2, 120.9, 118.3, 115.4, 112.6, 110.0, 52.0, 48.0, 45.0, 35.3, 13.8, 10.9, 8.6, 8.0.

MS (ESI) m/z = 488.24 $[M+H]^+$.

5.2.3.22 Synthese von (*E*)-3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)acrylsäureethylester (11)



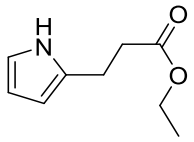
Zu einer Lösung aus Carbethoxymethylentriphenylphosphoran (4.46 g, 13.33 mmol, 2.0 Äq.) in trockenem DCM (30 ml) wird Pyrrol-2-carbaldehyd (637 mg, 6.66 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Wasser (50 ml) und Methyl-*tert*-butylether (50 ml) werden zugegeben, die Phasen getrennt und mit Methyl-*tert*-butylether (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mit Kieselgelchromatografie (Cyclohexan/Ethylacetat = 1/1) gereinigt, wobei das Zielprodukt als gelbes Öl erhalten wird.

Ausbeute: 496 mg, 3.0 mmol, 45%.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 9.11 (s, 1H), 7.50 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.83 (td, J = 2.7, 1.3 Hz, 1H), 6.61 – 6.40 (m, 1H), 6.19 (dt, J = 3.6, 2.5 Hz, 1H), 5.99 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 4.17 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) = 168.1, 134.5, 128.5, 122.5, 118.6, 114.3, 111.2, 110.9, 60.4, 14.4.

5.2.3.23 Synthese von 3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)propansäureethylester (12)

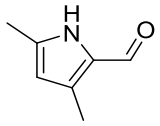


Zu einer Lösung aus (*E*)-3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)acrylsäureethylester (470 mg, 2.8 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (50 ml) wird Palladium (10%) auf Aktivkohle (30 mg) gegeben und Wasserstoff für 10 min durch die Lösung geleitet. Das Reaktionsgemisch wird unter Wasserstoffatmosphäre für 24 h gerührt und das Reaktionsgemisch über Kieselgur filtriert. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Produkt als gelbes Öl erhalten, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet wird.

Ausbeute: 451 mg, 2.7 mmol, 98%.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 8.46 (s, 1H), 6.59 (td, J = 2.6, 1.6 Hz, 1H), 6.02 (q, J = 2.9 Hz, 1H), 5.84 (tdd, J = 3.0, 1.4, 0.7 Hz, 1H), 4.08 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.88 – 2.77 (m, 2H), 2.55 (dd, J = 7.2, 6.3 Hz, 2H), 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

5.2.3.24 Synthese von 3,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd (14)



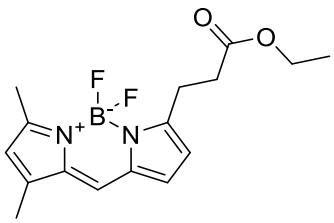
DMF (731 mg, 11.0 mmol, 1.1 Äq.) wird in 1,2-Dichlorethan (20 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Phosphoroxychlorid (1.025g, 11.0 mmol, 1.1 Äq.) wird zur Mischung gegeben und für 5 min gerührt. Dann wird 2,4-Dimethylpyrrol (951 mg, 10.0 mmol, 1.0 Äq.) und die Mischung für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung auf RT wird Natriumacetat (4.1 g, 50 mmol, 5.0 Äq.) in Wasser (20 ml) zugegeben und das Gemisch für 15 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wird die organische Phase getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (2 x 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (50 ml) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Zielprodukt als schwarzer Feststoff isoliert wird.

Ausbeute: 764 mg, 6.2 mmol, 62%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 11.49 (s, 1H), 9.45 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.20 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 175.8, 137.3, 132.5, 128.4, 111.2, 12.6, 10.4.

5.2.3.25 Synthese von 3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-5λ^4,6λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propansäureethylester (15)



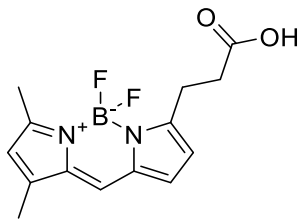
Zu einer Lösung aus 3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)propansäureethylester (407 mg, 2.43 mmol, 1.0 Äq.) und 3,5-Dimethyl-1*H*-pyrrol-2-carbaldehyd (300 mg, 2.43 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM wird Phosphoroxychlorid (227 μl, 2.43 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben bei 0°C und 6 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 0°C gekühlt, Bortrifluorid-etherat (1.2 ml, 9.72 mmol, 4.0 Äq.) und *N*,*N*-Diisopropylethylamin (1.7 ml, 9.72 mmol, 4.0 Äq.) werden zugegeben und das Reaktionsgemisch wird 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (50 ml) abgebrochen und mit Ethylacetat (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. $NaHCO_3$-Lsg. (3 x 50 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (3 x 50 ml) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 50/1) gereinigt wobei die Zielverbindung als dunkelroter Feststoff isoliert wird.

Ausbeute: 249 mg, 0.778 mmol, 32%.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 6.99 (s, 1H), 6.78 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 6.18 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.07 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.21 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.67 (dd, J = 8.3, 6.9 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) = 172.5, 160.3, 157.2, 143.8, 135.2, 133.3, 128.1, 123.8, 120.4, 116.7, 60.5, 33.4, 24.0, 14.9, 14.2, 11.2.

5.2.3.26 Synthese von 3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-5λ⁴,6λ⁴-dipyrrol[1,2-c:2',1'-*f*]-[1,3,2]diazaborinin-3-yl)propansäure (16)



Zu einer Lösung aus 3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-5λ⁴,6λ⁴-dipyrrol[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propansäureethylester (246 mg, 0.77 mmol, 1.0 Äq.) in Wasser (20 ml) und Methanol (40 ml) wird Kaliumcarbonat (213 mg, 1.54 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.1 N wässr. HCl (5 ml) und ges. wässr. NaCl-Lsg. (20 ml) abgebrochen und mit Ethylacetat (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und das Produkt als dunkelroter Feststoff erhalten.

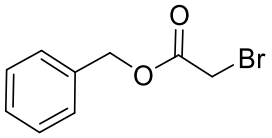
Ausbeute: 76 mg, 0.26 mmol, 34%.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 7.19 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.81 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 3.23 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.50 (s, 3H), 2.18 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) = 176.8, 160.7, 156.6, 144.0, 133.3, 131.3, 128.0, 123.9, 120.5, 116.6, 32.9, 23.7, 15.0, 11.3.

^{19}F NMR (471 MHz, $CDCl_3$) δ_F (ppm) = -145.4 (dd, J = 66.1, 33.1 Hz).

5.2.3.27 Synthese von 2-Bromessigsäureethylester (17)



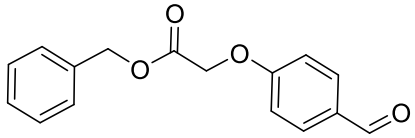
Benzylalkohol (1.36 g, 12.6 mmol, 1.0 Äq.) und Natriumhydrogencarbonat (3.18 g, 37.8 mmol, 3.0 Äq.) werden in Acetonitril suspendiert und auf 0°C gekühlt. Es wird 2-Bromacetylbromid (3.58 g, 17.6 mmol,1.4 Äq.) tropfenweise zugegeben und das Reaktionsgemisch für 40 min bei RT gerührt. Wasser (66 ml) wird zugegeben und es wird mit Dichlormethan (2 x 60 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 2.34 g, 10.2 mmol, 81%.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 7.33 – 7.38 (m, 5H), 5.21 (s, 1H), 3.87 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) = 167.1, 135.1, 128.8, 128.8, 128.5, 68.1, 25.9.

5.2.3.28 Synthese von 2-(4-Formylphenoxy)essigsäurebenzylester (18)



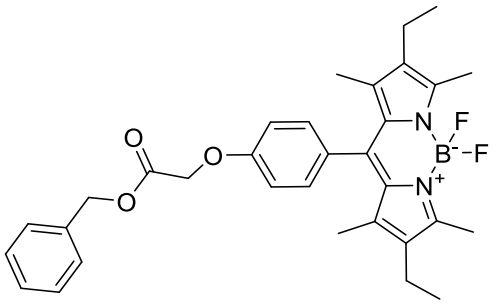
4-Hydroxybenzaldehyd (2339 mg, 10.2 mmol, 1.0 Äq.), Kaliumcarbonat (2820 mg, 20.4 mmol, 2.0 Äq.) und **17** (2340 mg, 10.2 mmol, 1.0 Äq.) werden in Aceton (50 ml) suspendiert und bei 65°C für 18 h gerührt. Wasser (80 ml) und Ethylacetat (80 ml) werden zugefügt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (2 x 80 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (Cyclohexan/Ethylacetat = 5/1) gereinigt und die Zielverbindung als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1640 mg, 6.1 mmol, 60%.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 9.82 (s, 1H), 7.79 – 7.71 (m, 2H), 7.32 – 7.23 (m, 5H), 6.96 – 6.87 (m, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.67 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) = 190.6, 167.9, 162.5, 134.9, 131.9, 130.8, 128.7, 128.5, 127.0, 114.9, 67.3, 65.2.

5.2.3.29 Synthese von 2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)essigsäure-benzylester (19)



Zu einer Lösung von **18** (853 mg, 3.0 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (150 ml) werden unter einer Argon-Atmosphäre Kryptopyrrol (739 mg, 6.0 mmol, 2.0 Äq.) und Trifluoressigsäure (7 Tropfen) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei RT gerührt. 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon (681 mg, 3 mmol, 1.0 Äq.) wird bei 0°C zugefügt es wird für 5 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird erneut auf 0°C gekühlt und Triethylamin (2.9 ml, 21.0 mmol, 7.0 Äq.) und Bortrifluorid-etherat (4.2 ml, 33.0 mmol, 11.0 Äq.) werden hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird auf RT erwärmt und für 18 h gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.1 N wässr. HCl (50 ml) abgebrochen und die organische Phase mit 0.1 N HCl (2 x 50 ml), 0.1 N wässr. NaOH (3 x 50 ml) und ges. wässr. NaCl-Lösung (3 x 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird über Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 50/1) gereinigt und das Produkt als glänzender, grüner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 890 mg, 1.64 mmol, 55%.

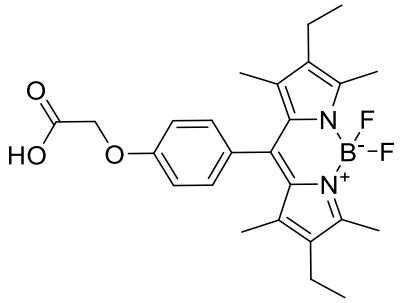
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 7.32 – 7.25 (m, 5H), 7.12 – 7.07 (m, 2H), 6.95 – 6.90 (m, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 2.45 (s, 6H), 2.23 (q, J = 7.5 Hz, 4H), 1.22 (s, 6H), 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) = 168.4, 158.2, 153.7, 139.8, 138.4, 135.1, 132.7, 131.1, 129.6, 129.1, 128.7, 128.6, 128.5, 115.3, 67.2, 65.5, 17.1, 14.6, 12.5, 11.8.

^{19}F NMR (471 MHz, $CDCl_3$) δ_F (ppm) = -145.82 (dd, J = 66.9, 32.6 Hz).

^{11}B NMR (160 MHz, $CDCl_3$) δ_B (ppm) = 3.87 (t, J = 33.6 Hz).

5.2.3.30 Synthese von 2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ4,5λ4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]-diazaborinin-10-yl)phenoxy)essigsäure (20)



Zu einer Lösung von 2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ^4,5λ^4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)essigsäurebenzylester) (890 mg, 1.64 mmol, 1.0 equiv) in MeOH (100 ml) wird Palladium (10%) auf Aktivkohle gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter einer Wasserstoffatmosphäre für 18 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird über Kieselgur filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 10/1) gereinigt und das Produkt als glänzender, grüner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 633 mg, 1.39 mmol, 85%.

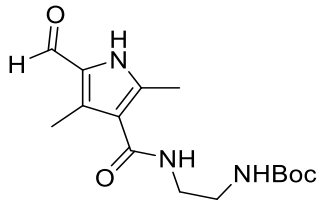
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 7.19 (m, 2H), 7.06 (m, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 6.65 (s, 1H, br) 4.72 (s, 2H), 2.52 (s, 6H), 2.28 (q, J = 7.5 Hz, 3H)1.31 (s, 6H), 0.97 (t, J = 7.5 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) = 172.4, 158.1, 153.7, 139.7, 138.3, 132.8, 131.1, 129.7, 129.1, 115.3, 65.3, 58.5, 46.6, 18.2, 17.1, 14.6, 12.5, 11.8, 8.6.

^{19}F NMR (471 MHz, $CDCl_3$) δ_F (ppm) = -145.7 (dd, J = 66.7, 32.4 Hz), -150.56 (s).

^{11}B NMR (160 MHz, $CDCl_3$) δ_B (ppm) = 3.86 (t, J = 33.5 Hz).

5.2.3.31 Synthese von *tert*-Butyl-(2-(5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamido)ethyl)carbamat (21)

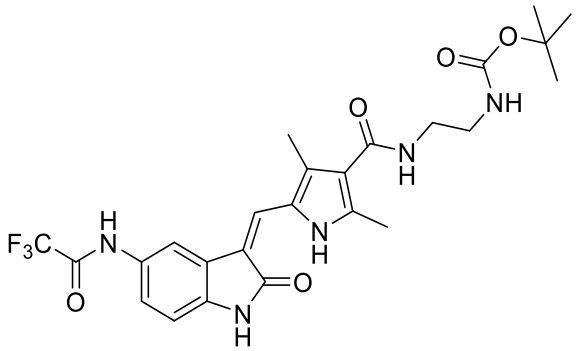


Zu einer Lösung aus 5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carbonsäure (260 mg, 1.56 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (10 ml) wird 1-[Bis(dimethylamin)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (596 mg, 1.56 mmol, 1.0 Äq.) zugefügt und die Suspension wird für 25 min bei RT gerührt. Eine Mischung aus *N*-Boc-ethylendiamin (245 μl, 1.72 mmol, 1.1 Äq.) and Diisopropylethylamin (542 μl, 3.12 mmol, 2.0 Äq.) in DMF (1 ml) wird tropfenweise hinzugefügt und das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Ethylacetat (50 ml) versetzt und mit 0.1 N wässr. HCl, 0.1 N wässr. NaOH, und ges. wässr. NaCl-Lsg. (jeweils 3 x 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt über Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und das Produkt wird als farbloses Öl erhalten, das sich beim Stehen verfestigt.

Ausbeute: 290 mg, 1.09 mmol, 70%.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) = 9.56 (s, 1H), 3.45 (dd, J = 6.9, 5.6 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.45 (s, 9H).

5.2.3.32 Synthese von *tert*-Butyl-(*Z*)-(2-(2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluor-acetamid)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamido)ethyl)carbamat (22)



Tert-Butyl-(2-(5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid)ethyl)carbamat 230 mg, 0.75 mmol, 1.0 Äq.) und 2,2,2-Trifluoro-*N*-(2-oxoindolin-5-yl)acetamid (182 mg, 0.75 mmol, 1.0 Äq.) werden in EtOH (10 ml) suspendiert und Piperidin (20 μl) wird zugefügt. Das Reaktionsgemisch wird in einem Mikrowellenreaktor bei 130°C für 90 min gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Produkt als oranger Feststoff erhalten wird.

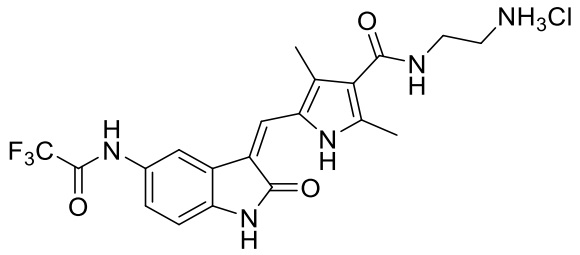
Ausbeute: 185 mg, 0.346 mmol, 46 %.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.65 (s, 1H), 10.91 (d, J = 54.5 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.60 (s, 2H), 7.33 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.86 (q, J = 7.1, 5.7 Hz, 1H), 3.28 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.12 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.41 (s, 9H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.6, 164.8, 155.7, 154.6, 154.4, 136.3, 136.3, 129.8, 129.7, 125.8, 125.7, 123.9, 120.7, 120.6, 117.2, 114.9, 114.5, 113.1, 109.4, 77.6, 44.3, 39.0, 28.2, 13.3, 10.4.

^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6) δ_F (ppm) = -73.87.

5.2.3.33 Synthese von (Z)-N-(2-Aminoethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluor-acetamido)indolin-3-yliden)-methyl)-1*H*-pyrrole-3-carboxamide Hydrochlorid (23)



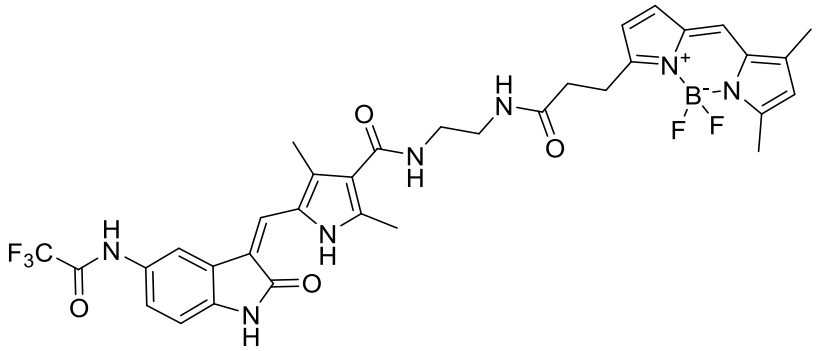
Tert-Butyl-(*Z*)-(2-(2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-ylidene)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamido)ethyl)-carbamat (185 mg, 0.346 mmol) wird in 2 N HCl in MeOH (20 ml) gelöst und für 72 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird mit DCM (50 ml) versetzt und auf 0°C abgekühlt. Der Niederschlag wird durch Filtration isoliert, im Luftstrom über Nacht getrocknet und das Produkt als oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 122 mg, 0.26 mmol, 75%.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O) δ_H (ppm) = 12.46 (s, 1H), 7.10 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.87 (dd, J = 8.1, 2.2 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.52 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.61 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.22 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ_C (ppm) = 169.0, 168.3, 168.00, 139.1, 137.0, 131.4, 126.7, 126.1, 124.12, 123.7, 120.1, 117.1, 113.4, 111.7, 110.2, 39.3, 37.0, 13.1, 10.2.

5.2.3.34 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (24)



Zu einer Lösung aus 3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-5λ⁴,6λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propansäure (28 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (1 ml) wird HATU (42 mg, 0.11 mmol, 1.1 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 30 min bei RT gerührt. Es wird eine Mischung aus Diisopropylethylamin (35 μl, 0.2 mmol, 2.0 Äq.) und (*Z*)-*N*-(2-Aminoethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid Hydrochlorid (46 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (1 ml) zugegeben und für 18 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Ethylacetat (30 ml) versetzt und mit 0.1 N wässr. HCl, 0.1 N wässr. NaOH-Lsg. und ges. wässr. NaCl-Lsg. (jeweils 3 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt, wobei das Produkt als roter Feststoff erhalten wird.

Ausbeute: 41 mg, 0.058 mmol, 58%.

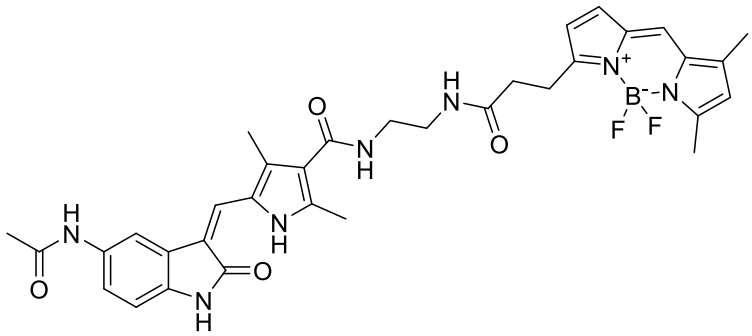
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d$_6$) δ_H (ppm) = 13.71 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.07 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.44 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.63 (d, J = 93.6 Hz, 1H), 3.29 (t, J = 5.1 Hz, 3H), 3.12 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.45 (d, J = 5.8 Hz, 3H), 2.40 (d, J = 13.6 Hz, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.10 (s, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d$_6$) δ_C (ppm) = 171.2, 171.1, 169.2, 165.0, 159.1, 157.7, 144.0, 143.2, 135.1, 134.4, 133.0, 129.7, 128.8, 128.1, 126.0, 125.5, 125.2, 121.9, 120.2, 119.9, 116.5, 113.0, 109.8, 104.9, 38.8, 38.7, 38.6, 38.4, 33.8, 30.6, 24.0, 14.5, 13.3, 10.9, 10.4.

^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6) δ_F (ppm) = -143.26 (dd, J = 66.8, 32.8 Hz).

^{11}B NMR (160 MHz, DMSO-d_6) δ_B (ppm) = 3.85 (t, J = 33.5 Hz).

5.2.3.35 Synthese von (*Z*)-5-((5-(Acetamido)-2-oxoindolin-3-yliden)methyl)-*N*-(2-(3-(5,5-difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxamid (BSc5317)



Zu einer Lösung aus (*Z*)-*N*-(2-(3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (15 mg, 0.021 mmol, 1.0 Äq.) in Wasser (5 ml) und Methanol (10 ml) wird Kaliumcarbonat (5.8 mg, 0.042 mmol, 2.0 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch für 18 h bei RT gerührt. Es werden ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (20 ml) und DCM (20 ml) hinzugefügt und die wässrige Phase wird mit DCM (2 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. wässr. NaCl-Lsg. (3 x 50 ml) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und Acetylchlorid (2.2 μl, 0.032 mmol, 1.5 Äq.) und Triethylamin (5.8 μl, 0.042 mmol, 2.0 Äq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (20 ml) abgebrochen und mit ges. wässr. NaCl-Lsg. (3 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und das Produkt als roter Feststoff erhalten

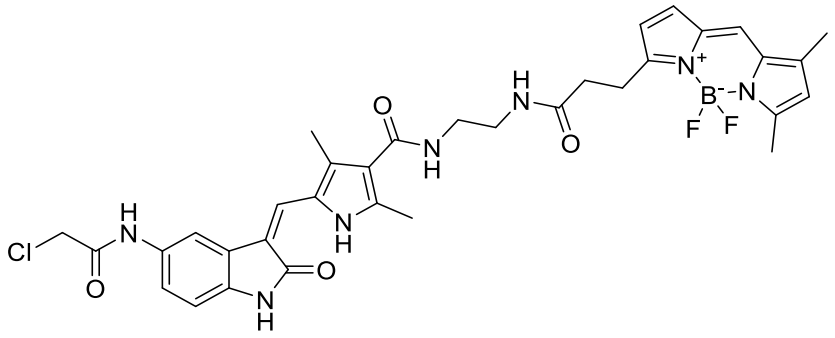
Ausbeute: 6.5 mg, 0.01 mmol, 48 %.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.64 (s, 1H), 10.81 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 7.84 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.29 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 0.98 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.5, 167.8, 164.5, 135.7, 134.5, 133.3, 128.9, 125.5, 125.4, 122.8, 120.5, 118.7, 115.2, 110.7, 109.3, 51.7, 46.5, 38.7, 37.0, 23.7, 13.3, 11.9, 10.4.

MS (ESI) m/z = 678.3 $[M+Na]^+$.

5.2.3.36 Synthese von (*Z*)-5-((5-(2-Chloracetamido)-2-oxoindolin-3-yliden)-methyl)-*N*-(2-(3-(5,5-difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5320)



Zu einer Lösung aus (*Z*)-*N*-(2-(3-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)propanamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (26 mg, 0.037 mmol, 1.0 Äq.) in Wasser (7 ml) und MeOH (15 ml) wird Kaliumcarbonat (10.2 mg, 0.074 mmol, 2.0 Äq.) zugefügt und das Reaktionsgemisch für 18 h bei RT gerührt. Es wird ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (30 ml) und DCM (30 ml) zugefügt und die wässrige Phase mit DCM (2 x 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (3 x 50 ml) gewaschen, mit $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt, 2-Chloracetylchlorid (4.4 μl, 0.056 mmol, 1.5 Äq.) und Triethylamin (10.2 μl, 0.074 mmol, 2.0 Äq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wird für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (20 ml) abgebrochen und mit ges. wässr. NaCl-Lsg. (3 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und das Produkt als roter Feststoff isoliert.

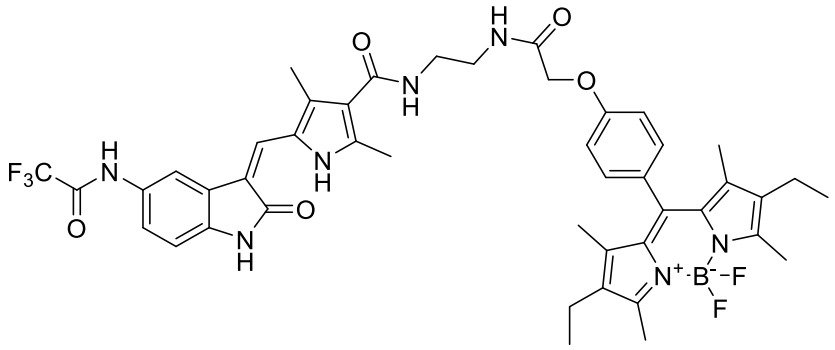
Ausbeute: 7.6 mg, 0.011 mmol, 30%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.65 (s, 1H), 10.87 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.06 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.55 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.30 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.26 (s, 1H), 3.30 – 3.25 (m, 1H), 3.12 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.41 (s, 2H), 2.26 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 171.2, 169.5, 164.9, 164.3, 159.1, 157.7, 144.0, 136.1, 135.1, 134.4, 133.0, 132.3, 129.4, 128.8, 125.6, 125.2, 123.2, 120.4, 120.2, 118.9, 116.5, 114.9, 111.0, 109.4, 43.5, 38.8, 38.5, 33.8, 24.0, 14.5, 13.3, 10.9, 10.5.

MS (ESI) m/z = 712.3 $[M+H]^+$.

5.2.3.37 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy) acetamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoro-acetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5382)



Zu einer Lösung aus 2-(4-(2,8-diethyl-5,5-Difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]-diazaborinin-10-yl)phenoxy)essigsäure (45 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) in DMF wird 1-Hydroxybenzotriazol Hydrat (15 mg, 0.11 mmol, 1.1 Äq.) und *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid (20 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq) gegeben und das Gemisch für 30 min bei RT gerührt. Es wird eine Mischung aus Triethylamin (42 μl, 0.3 mmol, 3.0 Äq.) und (*Z*)-*N*-(2-Aminoethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)-indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid Hydrochlorid (47 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 18 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Ethylacetat (30 ml) verdünnt und mit 0.1 N wässr. HCl, 0.1 N wässr. NaOH-Lsg. und ges. wässr. NaCl-Lsg. (jeweils 3 x 30 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und das Produkt als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 56 mg, 0.064 mmol, 64%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.65 (s, 1H), 11.12 (s, 1H), 10.96 (s, 1H), 8.30 (q, J = 7.5, 6.4 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.74 – 7.67 (m, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.33 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.32 – 7.24 (m, 2H), 7.22 – 7.15 (m, 2H), 6.93 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.43 – 3.36 (m, 4H), 3.34 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.44 (d, J = 1.8 Hz, 9H), 2.30 (q, J = 7.4 Hz, 4H), 1.32 (s, 6H), 0.95 (t, J = 7.6 Hz, 6H).

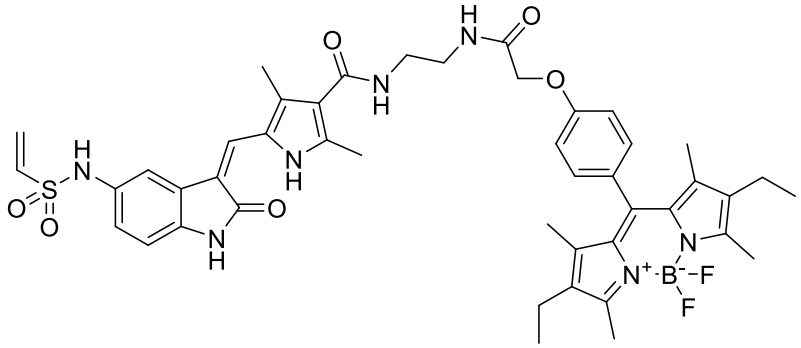
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.6, 167.6, 165.1, 158.1, 154.6, 154.3, 152.9, 140.5, 138.1, 136.3, 136.3, 132.5, 130.3, 129.9, 129.7, 129.3, 127.4, 125.8, 125.7, 123.8, 120.7, 120.5, 117.2, 115.5, 114.9, 114.6, 113.0, 109.5, 67.1, 38.7, 38.5, 16.4, 14.5, 13.3, 12.2, 11.5, 10.4.

^{11}B NMR (160 MHz, DMSO-d_6) δ_B (ppm) = 3.69 (t, J = 33.6 Hz).

^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6) δ_F (ppm) = -73.89, -143.02 (dd, J = 65.7, 28.2 Hz).

MS (ESI) m/z = 852.37 $[M-F]^+$.

5.2.3.38 Synthese von (*Z*)-*N*-(2-(2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy) acetamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(vinylsulfon-amido)indolin-3-ylidene)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (BSc5381)



Zu einer Lösung von (*Z*)-*N*-(2-(2-(4-(2,8-Diethyl-5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenoxy)acetamido)ethyl)-2,4-dimethyl-5-((2-oxo-5-(2,2,2-trifluoro-acetamido)indolin-3-yliden)methyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (56 mg, 0.064 mmol, 1.0 equiv) in Wasser (6 ml) und MeOH (8 ml) wird Kaliumcarbonat (25 mg, 0.179 mmol, 2.8 Äq.) gegeben und das Reaktionsgemisch wird für 18 h bei RT gerührt. Es wird ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. zugegeben und die wässrige Phase mit DCM (2 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden ges. wässr. NaCl-Lsg. (3 x 50 ml) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und 2-Chlorethansulfonylchlorid (10 μl, 0.1 mmol, 1.5 Äq.) und Triethylamin (18 μl, 0.13 mmol, 2.0 Äq.) werden zugegeben und das Reaktionsgemisch wird 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. wässr. $NaHCO_3$-Lsg. (20 ml) abgebrochen und mit ges. wässr. NaCl-Lsg. (3 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatografie (DCM/MeOH = 20/1) gereinigt und das Produkt wird als roter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 28 mg, 0.032 mmol, 51%.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ_H (ppm) = 13.68 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.31 (dd, J = 11.6, 6.1 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.96 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 16.4, 10.0 Hz, 1H), 6.06 – 5.96 (m, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.37 (s, 5H), 2.46 (s, 3H), 2.44 (s, 7H), 2.43 (s, 3H), 2.31 (q, J = 7.5 Hz, 5H), 1.32 (s, 6H), 0.95 (t, J = 7.5 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ_C (ppm) = 169.5, 167.6, 165.1, 158.1, 153.0, 140.5, 138.1, 136.4, 136.1, 136.1, 136.0, 132.5, 130.9, 130.3, 129.8, 129.3, 127.4, 126.8, 126.0, 125.6, 123.7, 123.7, 121.9, 120.5, 115.5, 114.7, 114.2, 114.2, 109.6, 67.1, 38.7, 38.5, 16.4, 14.5, 13.3, 12.2, 11.5, 10.5.

^{11}B NMR (160 MHz, DMSO-d_6) δ_B (ppm) = 3.79 (t, J = 34.2 Hz).

^{19}F NMR (471 MHz, DMSO-d_6) δ_F (ppm) = -142.99 (dd, J = 66.5, 29.5 Hz).

MS (APCI) m/z = 846.36 $[M\text{-}F]^+$.

5.2.4 Bestimmung der Reinheit der getesteten Substanzen durch HPLC

Verbindung	t_R / min	Reinheit / %	Methode	Wellenlänge / nm
BSc5221	1,827	99,4713	VWD	254
BSc5224[1]	1,778	98,6020	VWD	254
BSc5225[1]	2,967	98,4849	VWD	254
BSc5226[1]	6,412	96,7002	VWD	254
BSc5229	5,997	97,2261	VWD	254
BSc5230	5,602	95,8210	VWD	254
BSc5231[1]	2,653	97,4023	VWD	254
BSc5232	3,843	100,0000	VWD	254
BSc5233	4,752	95,2080	VWD	254
BSc5234	5,227	96,8706	VWD	254
BSc5235	4,965	96,3844	VWD	254
BSc5236	4,881	95,0225	VWD	254
BSc5237	4,985	96,1842	VWD	254
BSc5238	4,639	95,7320	VWD	254
BSc5315	4,282	95,1175	VWD	254
BSc5316	5,145	95,9804	VWD	254
BSc5317	5,597	99,8730	VWD	360
BSc5318	2,872	100,0000	VWD	254
BSc5319	1,823	95,7322	VWD	254
BSc5320	5,183	96,1730	VWD	360
BSc5371	2,862	96,1594	VWD	254
BSc5411	2,555	95,5186	VWD	254
BSc5381	8,685	95,2191	VWD	360
BSc5382	8,955	95,3825	VWD	360
BSc5300[2]	1,514	95,6875	VWD	254
BSc5301[2]	1,922	96,0849	VWD	254
BSc5302[2]	1,933	95,0714	VWD	254
BSc5303[2]	1,352	98,1651	VWD	254
BSc5304[2]	1,674	95,2979	VWD	254
BSc5305[2]	1,703	96,9724	VWD	254
BSc5306[2]	2,180	97,3103	VWD	254
BSc5307[2]	1,949	97,8748	VWD	254
BSc5309[2]	2,142	96,4205	VWD	254
BSc5310[2]	1,966	95,4217	VWD	254
BSc5311[2]	2,261	97,3760	VWD	254
BSc5312[2]	2,131	97,6470	VWD	254
BSc5313[2]	1,692	99,0749	VWD	254
BSc5314[2]	1,854	97,5080	VWD	254

[1] Substanz durch Theresa Neumann bereitgestellt; [2] Substanz durch Daniel Stubba bereitgestellt.

5.3 Pharmakologische Charakterisierung irreversibler FLT3 Inhibitoren

5.3.1 Biochemische Methoden

5.3.1.1 Vorbereitung der verwendeten Inhibitoren

Aus den hergestellten Inhibitoren wurden 10 mM Lösungen in DMSO hergestellt, indem 1 bis 5 mg Substanz exakt eingewogen werden, mit der entsprechenden Menge DMSO versetzt, für 30 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend zentrifugiert werden, um auszuschließen, dass ungelöster Feststoff vorliegt. Die Lagerung erfolgt bei -28°C. Die Identität und Stabilität der Substanzen wird regelmäßig mittels HPLC überprüft. Carfilzomib (MedChemExpress) und Crenolanib (MedChemExpress) wurden als 10 mM Lösung kommerziell bezogen. Bortezomib (Selleckchem), Hypothemycin (Abcam), Sunitinib (LC Labs) und Midostaurin (MedChemExpress) wurden kommerziell als Feststoff bezogen und wie angegeben eine 10 mM Lösung in DMSO hergestellt.

5.3.1.2 Zelllinien

Humane Leukämie-Zelllinien wurden bei der DSMZ kommerziell erworben (MV4-11, ACC102) oder von Prof. Dr. Katja Schmitz bereitgestellt (THP-1 (ACC16), Jurkat (ACC282)). Die Versuche zur Bestimmung der Zytotoxizität in NOMO1, U937 und MOLM14 Zelllinien sowie die Western-Blot Experimente mit MV4-11 Zellen wurden von Dr. Anjali Cremer und Prof. Dr. Kimberly Stegmaier durchgeführt (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Die Suspensionszellen werden in RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich) mit 10% FBS, L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 μg/ml) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen werden bei einer Dichte von 0.25 bis 1.5 x 10^6 Zellen / ml in Suspension kultiviert und alle 48 h bis 72 h im Verhältnis 1 zu 2 bis 1 zu 6 in frischem Medium aufgeteilt.

5.3.1.3 Bestimmung der Zellviabilität

5.3.1.3.1 Fluoreszente Endpunkt-Bestimmung der Zellviabilität

Um die Zytotoxischen Eigenschaften von Inhibitoren auf Leukämiezelllinien (MV4-11, THP1, Jurkat) zu bestimmen werden Suspensionszellen bei einer Dichte von 0.5 bis 1.5 x 10^6 Zellen / ml isoliert und in einer Dichte von 25.000 Zellen / well (90 μl, 277.778 Zellen / ml) in frischem RPMI-1640 Medium, das mit 0.1% FBS ergänzt wird, in 96-well Mikrotiterplatten (schwarz, transparenter Boden, Corning 3340) ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 werden die Zellen mit Inhibitor (10 μl, 10x konzentriert) oder DMSO (0.1%, unbehandelte Kontrolle) versetzt und für 72 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die finale Inhibitor-Konzentration erstreckt sich dabei von dem einstellig nanomolaren in den mikromolaren Bereich (10 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM). Die Auswertung der Zelltoxizität der Inhibitoren erfolgt über das Celltiter Blue Assay (Promega), indem 20 μl des Reagenz zugegeben werden und für 3 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert wird. Die entstehende Fluoreszenz wird mit einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten Lesegerät detektiert (Exc. 530 nm, Em. 560 nm) und ist proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen. Die relative Anzahl der lebenden Zellen wird aus dem Verhältnis der Fluoreszenz der behandelten und unbehandelten Zellen angegeben, wobei die Negativkontrolle (nur Medium) jeweils abgezogen wird. Die relative Inhibition des Zellüberlebens wird gegen die logarithmische Konzentration des Inhibitors aufgetragen und der IC_{50}-Wert durch Anpassung der Messwerte an die Gleichung "$Y=100/(1+10^{((LogIC50-X)*HillSlope)})$" bestimmt (GraphPad Prism 7.02, San Diego, CA, USA).

Die Bestimmung der zelltoxischen Wirkung erfolgt in technischen Triplikaten und in zwei unabhängigen Experimenten, wobei der Fehler als Standardabweichung angegeben wird. Wenn die zytotoxische Wirkung bei 1 μM weniger als 50% beträgt wird die zytotoxische Wirkung mit "IC_{50} > 1.000 nM" angegeben. Die so erhaltenen Dosis-Wirkungskurven sind in Kapitel 5.3.2 dargestellt.

5.3.1.3.2 Chemolumineszentes Endpunkt-Assay

Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der fluoreszenten Inhibitoren **BSc5320** und **BSc5381** erfolgt mit dem Celltiter-Glo 2.0 Assay (Promega). MV4-11, Jurkat oder THP1-Zellen werden bei Zelldichten zwischen 0.5 und 1.5 x 10^6 Zellen / ml isoliert und in einer Dichte von 10.000 Zellen / ml in weißen, 384-well Platten (20 μl / well) in RPMI-1640 Medium mit 0.1% FBS ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 werden die Zellen mit Inhibitor (10 μl, 10x konzentriert) oder DMSO (0.1%, Positivkontrolle) behandelt und für 72 h bei 37C° und 5% CO_2 inkubiert (Finale Konzentrationen: 10 μM, 7.5 μM, 5 μM, 2.5 μM, 1 μM, 500 nM, 100 nM). Es werden bei Raumtemperatur 20 μl Celltiter-Glo 2.0 Reagenz zugegeben, die Zellen für 2 min unter Schütteln lysiert und die Chemolumineszenz nach 10 min mit einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten Lesegerät bestimmt (500 ms Integrationszeit). Die Berechnung der relativen Inhibition des Zellüberlebens und die Bestimmung des IC_{50} erfolgt dabei wie im Kapitel 5.3.1.3.1 beschrieben.

Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung der Verbindungen **BSc5318**, **BSc5371** und **BSc5311** in U937, MOLM14 und NOMO1 Zellen erfolgte mit dem Celltiter-Glo Assay (Promega) durch Dr. Anjali Cremer und Prof. Dr. Kimberly Stegmaier (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Die Zellen werden zu einer Dichte von 15.000 Zellen / ml resuspendiert und 40 μl in 384-well Platten ausgesät. Die Zellen werden mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität an Tag 0 und nach Behandlung an Tag 3 bestimmt. Die Lumineszenz wird mit einem Fluostar Omega Reader (BMG Labtech) Mikrotiterplatten Lesegerät bestimmt.

5.3.1.3.3 Zeitabhängige Bestimmung der Zelltoxizität

Zur Bestimmung der zeitabhängigen zytotoxischen Wirkung von **Crenolanib** und **BSc5371** in MV4-11 Zellen werden die Zellen bei einer Dichte von 0.5 bis 1.5 x 10^6 Zellen / ml in RPMI-1640-Medium mit 0.1% FBS resuspendiert und in einer 384-well Platte ausgesät (2.000 Zellen / well, 27 μl). Die Zellen werden mit Inhibitor (5 μM, 500 nM, 250 nM, 50 nM, 25 nM, 5 nM, 2.5 nM and 0.5 nM) oder DMSO (0.1%) behandelt

und anschließend mit dem RealTime-Glo MT Reagenz (Promega, 30 μl) für 77 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Chemolumineszenz wird nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 25 h, 27 h, 29 h, 31 h, 33 h, 35 h, 37 h, 49 h, 54 h, 57 h und 77 h Inkubationszeit gemessen (500 ms Integrationszeit). Die Berechnung der relativen Inhibition des Zellüberlebens und die Bestimmung des IC_{50}-Wertes erfolgt dabei wie im Kapitel 5.3.1.3.1 beschrieben.

5.3.1.4 Western Blot

Die Untersuchung der Proteinexpression und -phosphorylierung in MV4-11-Zellen erfolgte durch Dr. Anjali Cremer und Prof. Dr. Kimberly Stegmaier (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Proteine werden aus MV4-11 Zellen extrahiert durch Behandlung mit Lysis-Puffer (Cell Signaling Technology) und mit Complete EDTA-freiem Protease Inhibitor Cocktail ergänzt (Roche Diagnostics). Proteinproben werden durch SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membranen transferiert, die mit 5% BSA geblockt werden und mit Primärantikörpern gegen Phospho-FLT3 (Y969, Cell Signalling Technology Cat. No. 3463), FLT3 (8F2, Cell Signaling Technology Cat. No. 3462), Phospho-STAT5 (Y694, Cell Signaling Technology, Cat. No. 9351), STAT5 (Cell Signaling Technology Cat. No. 9363) und GAPDH (Santa Cruz Biotechnology Cat. No. sc-47724) behandelt werden. Die Membranen werden in TBS-T gewaschen und mit den geeigneten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Signale werden durch Chemolumineszenz detektiert (ThermoFisher Scientific).

5.3.1.5 In-Gel Trypsinierung von FLT3 und MALDI-MS/MS Analyse

2 μg FLT3wt (ProQinase) werden in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.4, 100 μl Gesamtvolumen) verdünnt und mit 100 μM Inhibitor für 5 h bei 37°C inkubiert. Die Proben werden lyophilisiert und in 20 μl 1x Lämmli-Puffer bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Proben werden durch SDS-PAGE (12% Trenngel, 5% Sammelgel) getrennt, mit kolloidalem Coomassie angefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Proteinbanden in Höhe der 73 kDa-Bande werden in ca. 1 mm^3 große Würfel geschnitten und abwechselnd mit 100 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer (Ambic) und Acetonitril (ACN) gewaschen (jeweils 4 x 200 μl). Dann werden 100 μl einer 10 mM DTT Lösung in 100 mM Ambic zugegeben und für 25 min bei 60°C inkubiert. Der

Überstand wird verworfen und die Gelstücke werden abwechselnd mit ACN und Ambic gewaschen (4-mal). 100 μl einer 10 mM 2-Iodacetamid (IAA) Lösung werden zugegeben und bei 37°C für 40 min inkubiert. Der Überstand wird verworfen und die Gelstücke werden abwechselnd mit ACN und Ambic gewaschen. Die Gelstücke werden für 10 min in 20 μl einer 20 ng / μl Trypsin/Lys C mix Lösung (Promega) rehydriert, mit 60 μl einer 25 mM Ambic Lösung überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. 10 μl einer 1% Ameisensäure-Lösung werden zugegeben und der Überstand wird lyophilisiert. Die Proben werden in 10 μl einer 0.1% TFA Lösung rekonstituiert und mit μ-C18 ZipTip (Merck Millipore) Pipettenspitzen gereingt. Die Proben werden in einer α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure Matrix auf die Probenplatte gegeben und die Massenspektren werden auf einem Bruker Daltonics autoFlex MALDI TOF Spektrometer mit positiver Polarität aufgenommen. Die Spektren werden mit der Software Mmass 5 ausgewertet (siehe Kapitel 5.3).

5.3.1.6 Bestimmung der Inhibition der Kinaseaktivität

5.3.1.6.1 ADP Glo Assay

Die Inhibition der Kinaseaktivität durch die FLT3-Inhibitoren wird mit dem ADP-Glo Kinase Assay (Promega) durchgeführt. Aktive Kinase wird von Promega (FLT3-D835Y, 50 ng je Assay), Invitrogen (FLT3-ITD, 100 ng je Assay) und ProQinase (FLT3-wt, 100 ng je Assay) bezogen. Die jeweilige Kinase wird mit der 10-fachen Konzentration der finalen Assay-Konzentration für die angegebenen Zeiten vorinkubiert (5 bis 30 min). Dann wird Kinase Reaktionspuffer A (4 μl) und eine Mischung (4 μl) aus myelobasischem Protein (MBP, finale Konzentration 0.1 mg/ml) und ATP (finale Konzentration 100 μM bis 1 mM) in Kinase Reaktionspuffer A zugegeben und bei Raumtemperatur für 120 min inkubiert. ADP Glo Reagenz (10 μl) wird hinzugefügt und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kinase-Detektionsreagenz (20 μl) wird zugegeben und 30 min (100 μM ATP) oder 60 min (1 mM ATP) bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden die Proben in eine 384-well Mikrotiterplatte überführt und die Chemolumineszenz mit einem Tecan M1000 Mikroplatten-Lesegerät detektiert. Die relative Inhibition der Kinaseaktivität wird berechnet aus dem Signal der Kinasereaktion mit Inhibitor im Verhältnis zur Kinasereaktion ohne Inhibitor, wobei

jeweils die Kontrolle ohne Kinase abgezogen wird. Zur Bestimmung der IC_{50}-Werte werden die relative Inhibition der Kinaseaktivität gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen und an eine Gleichung der Formel "$Y=100/(1+10^{((LogIC50-X)*HillSlope)})$" angepasst (GraphPad Prism 7.02, San Diego, CA, USA).

5.3.1.6.2 Bestimmung der Kinaseinhibition durch die Leitstruktur BSc5371

Die Bestimmung der K_d-Werte für die Leitstruktur **BSc5371** mit FLT3wt und verschiedenen FLT3-Mutanten erfolgt mit der KINOMscan® Assay Plattform durch das Unternehmen DiscoverX (San Diego, CA, USA) und wird wie in der Literatur beschrieben durchgeführt. Die Untersuchungen werden dabei mit einer 11-Punkt seriellen 3-fach Verdünnungsreihe durchgeführt, die bei 30 μM beginnt (siehe Kapitel 5.3.2.6). Für die FLT3-ITD/F691L und die FLT3-ITD/D835V Mutationen wird die Sättigung der Kurve im ersten Assay nicht erreicht und eine weitere serielle 11-Punkt Verdünnungsreihe mit 300 nM Inhibitor als höchste Konzentration durchgeführt. Die Bindungskonstanten werden mit der Gleichung „Response = Background + ((Signal – Background)/(1+($K_d^{Hill\ Slope}$ / Dose $^{Hill\ Slope}$))" berechnet.

Zur Bestimmung der Inhibition weiterer Kinasen durch **BSc5371** und **BSc5311** werden die Restaktivitäten verschiedener Kinasen in der KinaseProfiler Plattform durch Eurofins Pharma Discovery Services (Dundee, United Kingdom) bestimmt. Die Assays werden in einem enzymatisch-radiometrischen Assay mit 10 μM ATP γ-^{33}P durchgeführt. Dabei wird Kinasereaktion durch das entstehende ^{33}P-markierte Substrat mit einem Szintillationsdetektor quantifiziert. Die relative Inhibition wird als Verhältnis der Zerfallsvorgänge nach Zugabe von Inhibitor und ohne Inhibitor berechnet.

5.3.1.7 Durchführung des Zebrafisch-Embryonen Toxizitätsassays

Adulte Zebrafische (Wildtyp, *Danio rerio*) werden in einem Labor ohne Tageslicht in 60 l Aquarien gehalten, die mit Pflanzenbewuchs, Aquarienpumpen und Sand ausgestattet sind. Der Raum ist konstant auf 28°C klimatisiert und das Raum- und Aquarienlicht auf einen 12 h dunkel / 12 h hell Rhythmus programmiert. Adulte

Zebrafische werden zur Paarung am Abend in Zuchtbecken mit 1 l Volumen (2 Tiere / 1 l Wasser) oder Zuchtaquarien mit 20 l Volumen (6 bis 8 Tiere / 20 l Wasser) gegeben, die mit Plastikpflanzen und entfernbaren Sieben am Boden ausgestattet sind. Am nächsten Morgen werden die adulten Tiere 2 bis 3 h nach Beginn des Lichtzyklus wieder in die Aquarien zurückgesetzt und die Zebrafisch-Embryonen werden gesammelt, mit E3-Medium gewaschen und in Petrischalen mit E3-Medium platziert. Nach 24 h (1 dpf) werden lebende Embryonen, erkennbar an der Ausbildung und Differenzierung des Chorions zufällig in 96-well Platten (1 Embryo / well) oder 24-well Platten (10 Embryonen / well) sortiert.

Die Testsubstanzen werden aus der 10 mM Vorratslösung zum 10-fachen der finalen Konzentration in E3-Medium verdünnt und auf ungelösten Feststoff überprüft. Die Embryonen (24 hpf) werden in 180 μl E3-Medium (96-well Platten) oder 450 μl E3-Medium (24-well Platten) überführt und 20 μl bzw, 50 μl 10x konzentrierte Inhibitorlösung zugegeben wodurch die finale (1x) Testkonzentration erhalten wird. Das Überleben der Embryonen wird alle 24 h durch Beobachtung des Herzschlags festgestellt. Die Überlebensraten werden auf mit 0.1% DMSO-behandelte Embryonen bezogen. Bilder werden mit einer Panasonic Lumix GX8 aufgenommen, die mit einem Lumix G Makro 1:2.8/30 ASPH Objektiv und einem 10 mm und einem 16 mm Erweiterungsring ausgestattet ist (siehe Kapitel 5.3.5). Die Fluoreszenz nach Inkubation der Embryonen mit **BSc5320** und **BSc5381** wird mit einem AxioScope.A1 Mikroskop (Zeiss) beobachtet und die Bilder mit dem multispektralen Detektor Nuance FX (Cambridge Research & Instrumentation, Woburn, MA) aufgenommen.

Die Versuchstierhaltung ist von der Wissenschaftsstadt Darmstadt gemäß Tierschutzgesetz und Tierschutz-Versuchstierverordnung genehmigt. Alle Fische werden ethisch behandelt und die Anzahl der in den Versuchen untersuchten Embryonen so gering wie möglich gehalten. Embryonen, die im Rahmen von Experimenten untersucht werden, werden spätestens 120 hpf (5 dpf), noch vor Beginn der selbstständigen Nahrungsaufnahme, mit Eugenol euthanasiert.

5.3.1.8 Durchführung des Zebrafisch- Embryonen Fluchtreflexassays

Zebrafisch-Embryonen werden 24 h nach der Eiablage (hpf) dechorioniert und in 96-well Platten mit 198 μl E3-Medium gesetzt. Die Embryonen werden mit 2 μl einer 100-fach konzentrierten Wirkstofflösung in DMSO (2 μl, Endkonzentration: 25 μM, 50 μM) für 24 h, 48 h oder 72 h bei 28°C inkubiert. Der Endpunkt der Inkubation und der Zeitpunkt der Bewegungsaufnahme ist jeweils 96 hpf. Das Überleben der Embryonen wird visuell durch den beobachtbaren Herzschlag bestimmt. Für die Aufnahme des durch Berührung ausgelösten Fluchtreflexes werden die Embryonen auf einen Objektträger mit Vertiefung platziert. Dieser ist auf einer LED-Lichtscheibe (SL-300 LED Soft Light, Dörr, Neu-Ulm, Deutschland) unter einer MotionBlitz EoSens mini1 MC1370 Highspeed-Kamera (Mikrotron, Unterschleißheim, Deutschland) platziert. Der Fluchtreflex wird durch einen leichten Berührungsstimulus an den Oberkörper des Embryos ausgelöst, wofür eine leicht gebogene Nähnadel verwendet wird. Für jeden Embryo werden bis zu 50 Berührungsstimuli ausgeübt. Es werden insgesamt 4 Embryonen inkubiert, wobei nur Gruppen in dem Fluchtreflex-Assay untersucht werden, bei denen mindestens zwei Embryonen nach 96 hpf überlebt haben. Es werden zwei (bei 50% Überlebensrate) oder drei Embryonen (für 75% oder 100% Überlebensrate) untersucht. Dabei wird die Bewegung 96 hpf für maximal 3 Sekunden bei 500 Bilder/Sekunde mit der MotionBlitzDirector2 Software aufgezeichnet. Für jeden Embryo werden, soweit möglich, drei Fluchtreflexe aufgezeichnet. Die Bestimmung der Bewegungsamplitude α erfolgt nach Aufnahme der Bewegung mit einem von Prof. Stefan Roth (FB Informatik, TU Darmstadt) zur Verfügung gestellten Matlab-basierten Skript. Dabei wird der Winkel α der Körperbeugung zwischen drei Punkten, der Spitze des Kopfes, dem Dottersack und der Schwanzspitze, bestimmt. Die Graphen der analysierten Bewegungen sind in Kapitel 5.3.7.4 zusammengefasst. Die Anzahl der Bewegungen, die Gesamtdauer des Reflexes und die Amplitude und Dauer der *C-Bend* werden anhand der Graphen bestimmt. Die statistische Analyse erfolgt mit GraphPad Prism 7.02. Dazu wird ein zweiseitiger, ungepaarter t-test (parametrischer Test, $\alpha = 0.05$, 95% CI) unter der Nullhypothese (H_0), dass nach Behandlung mit dem Inhibitor kein Unterschied zu dem Mittelwert der Kontrollgruppe besteht und der Alternativhypothese (H_1), dass ein Unterschied in den Mittelwerten besteht, ausgeführt.

Die detaillierten statistischen Parameter (95% Konfidenzintervall, R^2) sind in Kapitel 5.3.7.3 beschrieben.

5.3.1.9 Bestimmung der Halbwertszeit elektrophiler Inhibitoren

Die Halbwertszeit der elektrophilen Inhibitoren wird in einem HPLC-basierten Assay bestimmt. Die verwendeten Puffer werden für 30 min im Ultraschallbad behandelt und dann für 6 h Argon durch die Lösung geleitet. 5 μl einer 1 mM Inhibitor-Vorratslösung in DMSO werden mit 45 μl Acetonitril, 50 μl einer 10 mM Lösung des Nukleophils in 100 mM Kaliumphosphatpuffer und 400 μl 100 mM Kalium-phosphatpuffer unter einer Argon-Atmosphäre in ein HPLC-Fläschchen (1.5 ml) gegeben. Die erste Injektion (20 μl Injektionsvolumen) in die HPLC wird unmittelbar nach dem Zusammengeben gestartet (t = 0 min). Der pH-Wert des Kaliumphosphatpuffers ist, wie bei den Ergebnissen des jeweiligen Assay angegeben, auf pH 6.8, 7.4 oder 8.0 eingestellt. Die Proben werden bei t = 0 min, 34 min, 68 min, 102 min, 136 min, 170 min und 204 min injiziert und gemessen. Basierend auf einer Laufzeit von 17 min pro Probe können somit zwei Elektrophile alternierend charakterisiert werden. Die Fläche des zum Inhibitor gehörenden Signals wird bestimmt (mAU · s) und die Fläche relativ zur Messung bei 0 min für jeden Zeitpunkt gegen den Zeitpunkt der Injektion aufgetragen. Die Halbwertszeit wird durch Anpassung einer Gleichung ($Y = (Y_0 - \text{Plateau}) \cdot e^{(-k \cdot X)} + \text{Plateau}$) für einphasigen exponentiellen Verfall an die Messwerte berechnet (GraphPad Prism 7.02). Die Halbwertszeit des Elektrophils wird durch die Gleichung „$t_{1/2} = \ln(2) / k$“ bestimmt.

5.3.1.10 Nachweis der Fluoreszenz mit SDS-PAGE und Western Blot

500 ng FLT3-D835Y (Promega, 10 μl) werden in 100 mM Kalimphosphatpuffer (pH 7.4, Gesamtvolumen 100 μl) verdünnt und mit 100 μM der Testsubstanz für 3 h bei 37°C inkubiert. Dann wird 1 μl einer 100-fach konzentrierten DMSO-Lösung des fluoreszenten FLT3-Inhibitors zugegeben (1 μM Endkonzentration) und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Proben werden lyophilisiert, mit 10 μl einer 10 mM Glutathion-Lösung rekonstituiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Proben werden dann durch Zugabe von 10 μl 2x Lämmli-Puffer (10 μl) denaturiert und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben werden durch SDS-PAGE (12% Trenngel, 5% Sammelgel) getrennt und auf eine

PVDF-Membran (2 mA / cm^2 Gel, 45 min) mit Western Blot Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 10% MeOH) transferiert. Die Membran wird zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen und in einem Luftstrom für 30 min getrocknet. Die Fluoreszenz wird mit einem Vilber Fusion FX7 Edge Kamerasystem aufgenommen mit den Einstellungen, die bei dem jeweiligen Experiment angegeben sind.

5.3.1.11 Bestimmung der Inhibition von isoliertem Proteasom

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der verwendeten Inhibitoren des Proteasoms wird mit dem 20S Proteasom Assay Kit (Enzo Life Sciences) durchgeführt. Zur Bestimmung der Aktivität der β5-Untereinheiten des Immuno- und konstitutiven Proteasoms wird das Substratpeptid Suc-LLVY-AMC verwendet. Die Messungen werden als technische Duplikate durchgeführt, wobei die angegebenen Inhibitionswerte den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten darstellen. Die Inhibitoren werden aus den 10 mM Vorratslösungen in DMSO zur Testung in Proteasom Assay-Puffer (Enzo Life Sciences, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl2) verdünnt (200 nM Stock, finale Konzentration 100 nM). Diese werden zum Proteasom (200 ng / well) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Substrat zugegeben (100 μM Endkonzentration) und die entstehende Fluoreszenz (Exc. = 360 nm, Em. = 460 nm) für 60 min bei RT in einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten-Lesegerät detektiert. Die relative Inhibition ergibt sich aus dem Verhältnis der Steigung der Fluoreszenz des mit und ohne Inhibitor inkubierten Proteasoms, wobei jeweils die Steigung der Negativkontrolle subtrahiert wird.

5.3.1.12 Bestimmung der zellulären Inhibition des Proteasoms

Die Bestimmung der Inhibition des zellulären Umsatzes der Substrate **BSc5098** und Suc-LLVY-AMC erfolgt mit 25.000 Zellen pro Well (60 μl) in RPMI-1640-Medium, das mit 0.1% FBS versetzt ist. Die Inhibitoren werden in einer seriellen Verdünnungsreihe in RPMI-1640-Medium mit 0.1% FBS in der 10-fachen der finalen Konzentration vorgelegt, zu den Zellen gegeben (10 μl) und für die angegebene Zeit (0 h bis 13 h) bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Es werden 30 μl einer 100 μM-Lösung von **BSc5098** in RMP-1640 Medium zu jedem Well gegeben, für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert

und die Substratumsetzung für 60 min bei 37°C in einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten-Lesegerät durch Detektion der resultierenden Fluoreszenz gemessen (Exc. 360 nm, Em. 460 nm). Die Rate der Fluoreszenz-Entstehung wird berechnet und die relative Inhibition für jede Konzentration ergibt sich relativ zur Kontrolle ohne Inhibitor, wobei jeweils die Fluoreszenz der Negativkontrolle subtrahiert wird. Die finalen Inhibitor-Konzentrationen sind auf das Endvolumen bezogen (10 μM, 1 μM, 500 nM, 182 nM, 91 nM, 33,3 nM, 17 nM). Die angegebenen Wirkstoffkonzentrationen der halbmaximalen Inhibition sind der Mittelwert der technischen Triplikate und die Messwerte werden an eine Kurve der Gleichung "$Y=100/(1+10^{((LogIC50-X)*HillSlope)})$" mit GraphPad Prism 7.02 angepasst. Die so erhaltenen Dosis-Wirkungskurven sind in Kapitel 5.3.2 zusammengefasst.

5.3.2 Dosis-Wirkungskurven

5.3.2.1 Dosis-Wirkungskurven der Zellviabilität-Testungen

5.3.2.1.1 MV4-11 Zellen

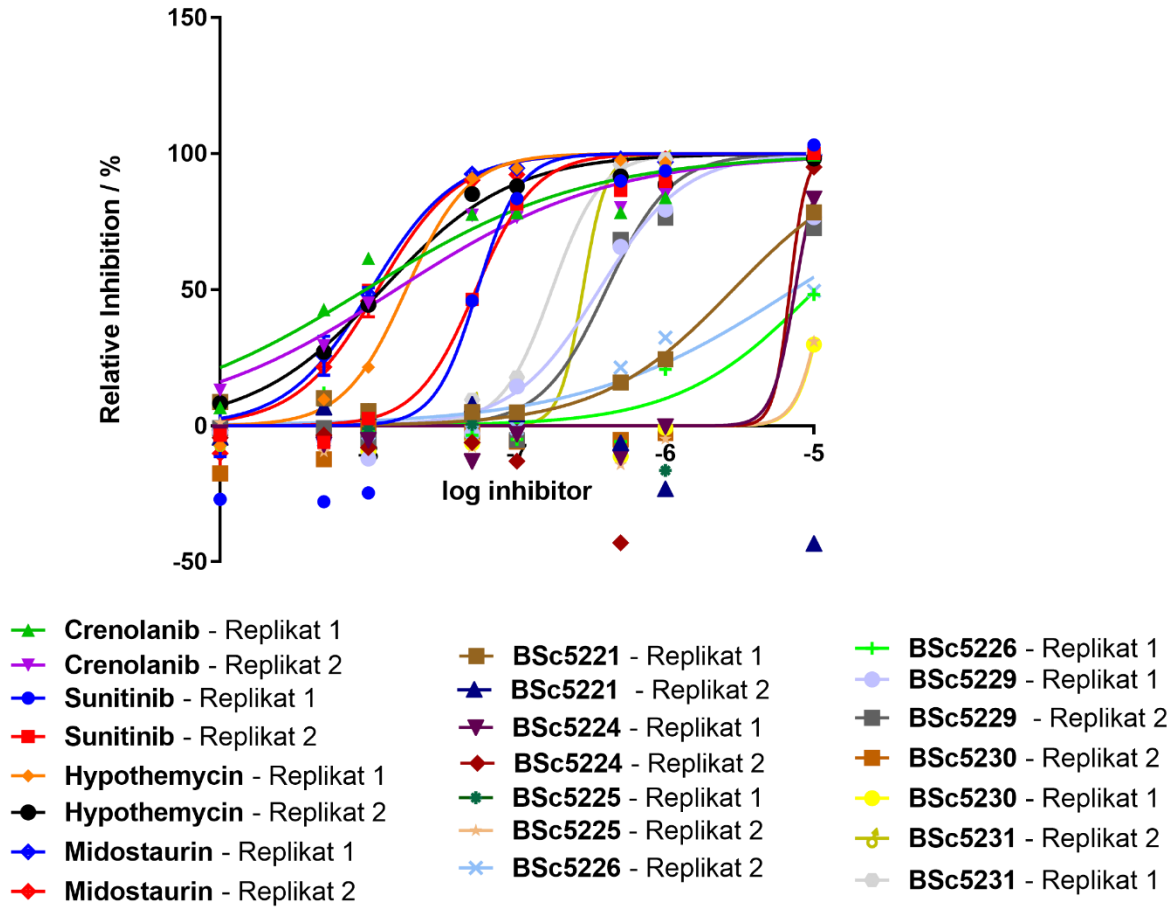


Abbildung 108. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den Referenzinhibitoren **Crenolanib**, **Sunitinib**, **Midostaurin** und **Hypothemycin** und den reversibel bindenden Fragmenten **BSc5221**, **BSc5224**, **BSc5225**, **BSc5226**, **BSc5229**, **BSc5230** und **BSc5231** durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

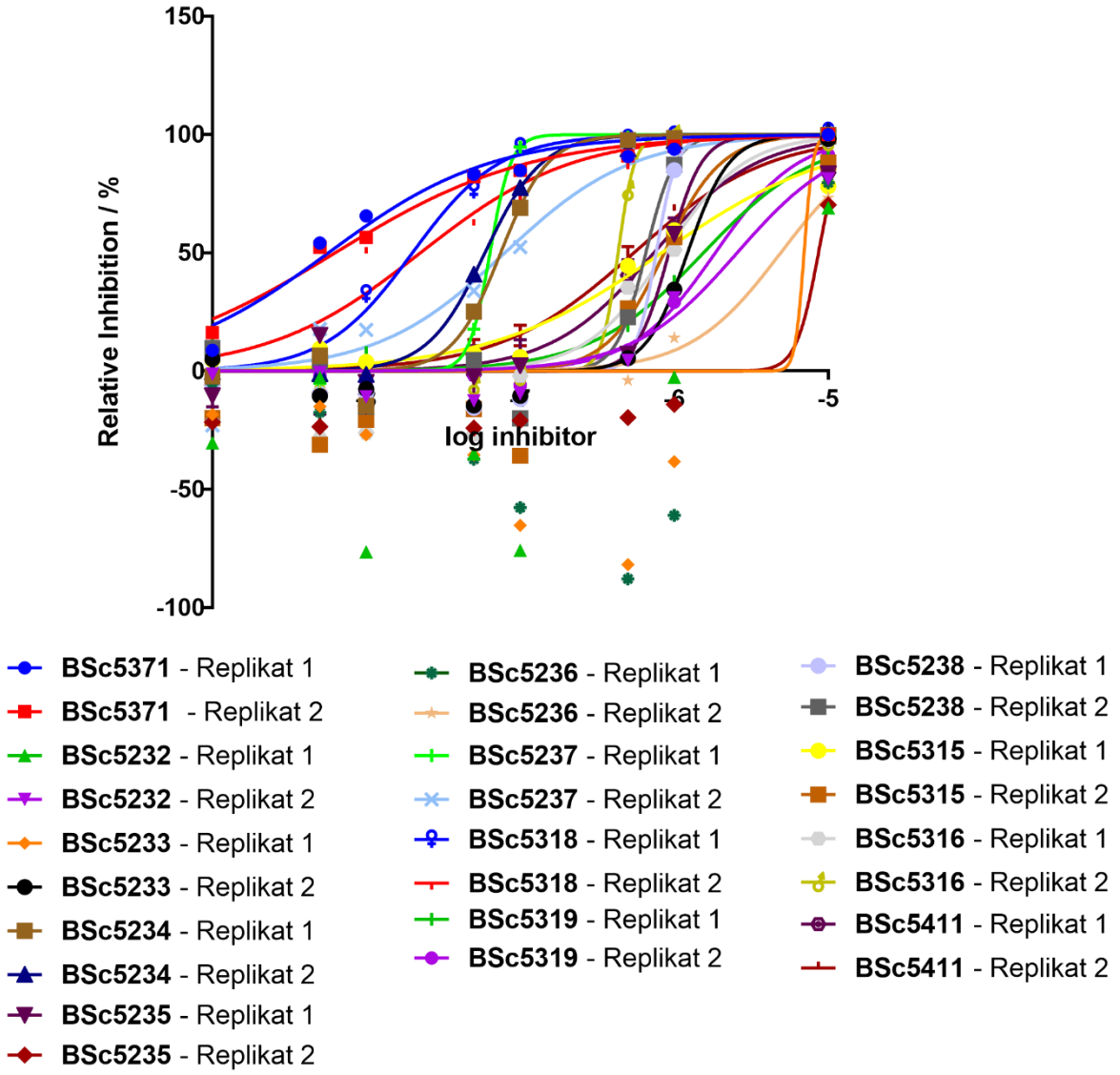


Abbildung 109. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den Indolinon-basierten FLT3-Inhibitoren durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

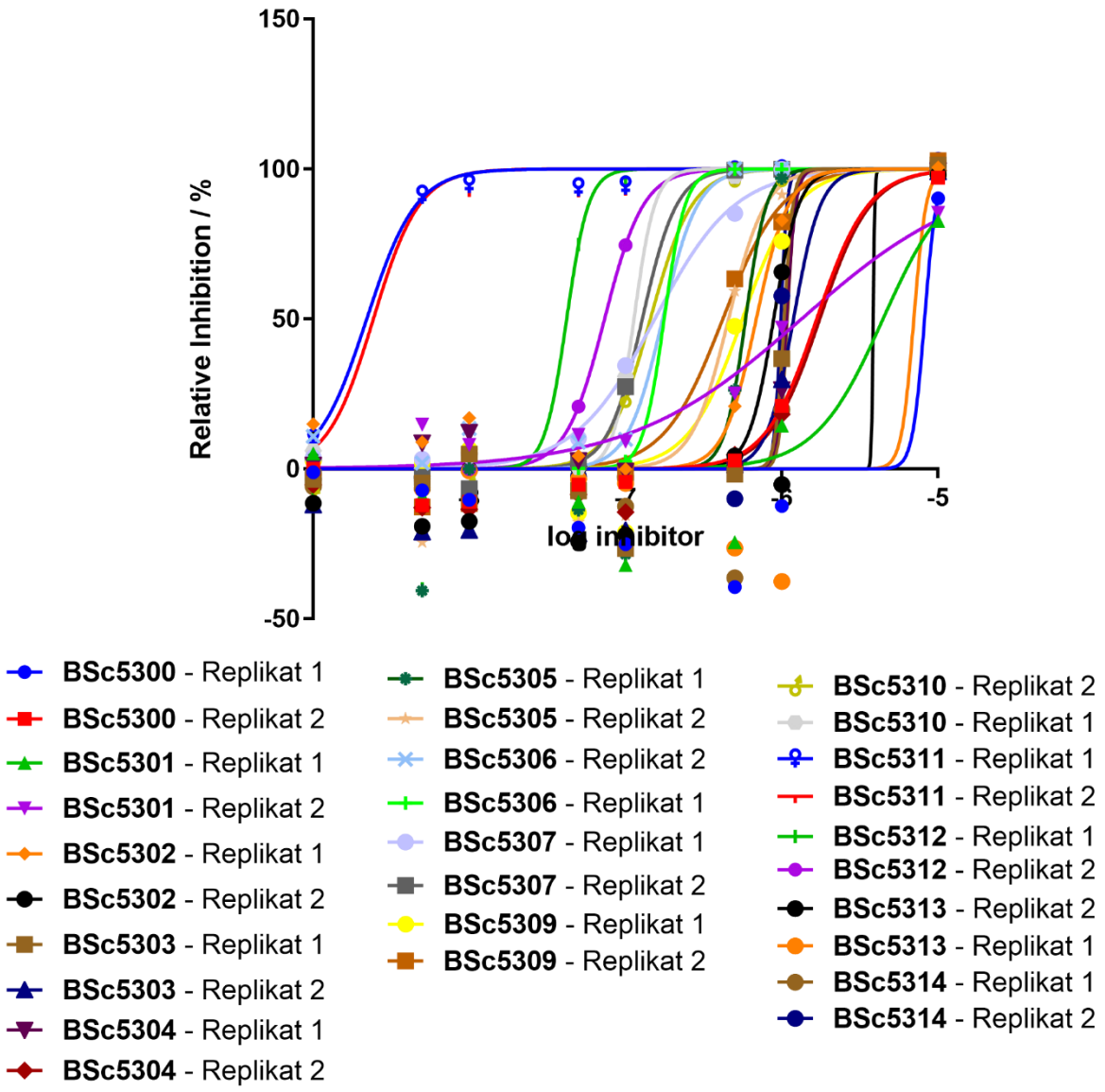


Abbildung 110. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den Bisaminopyrimidin-basierten FLT3-Inhibitoren durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

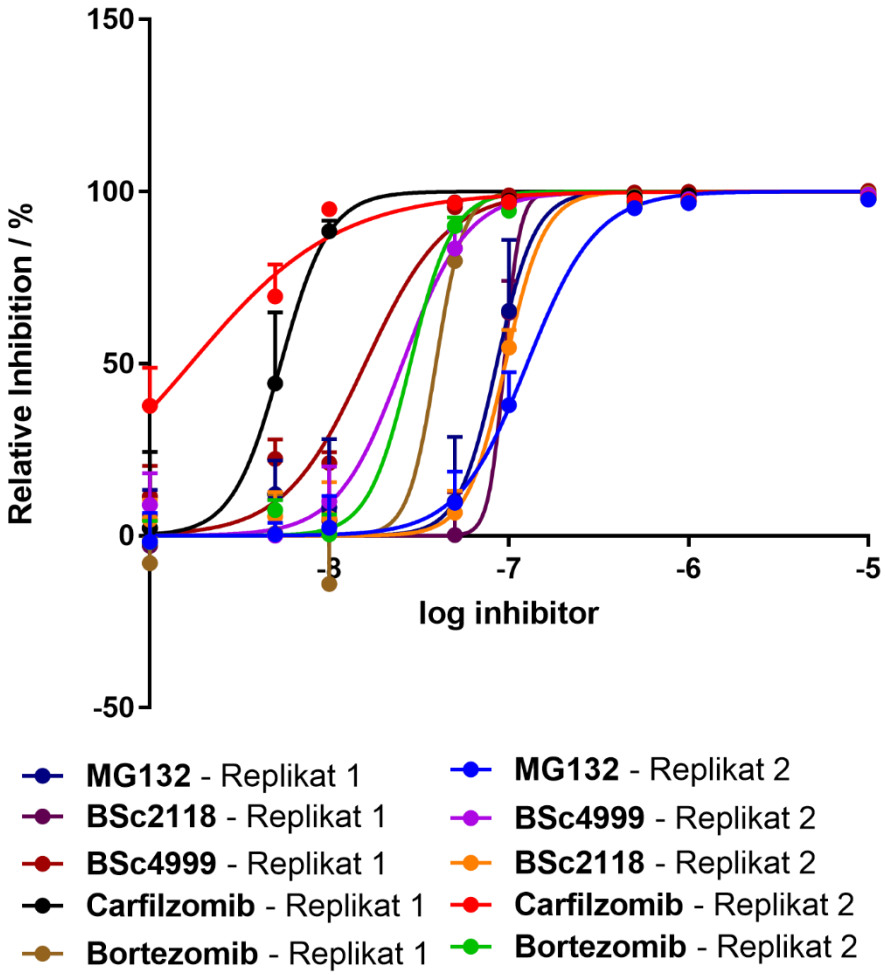


Abbildung 111. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den bereits in der Literatur beschriebenen Proteasom-Inhibitoren durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

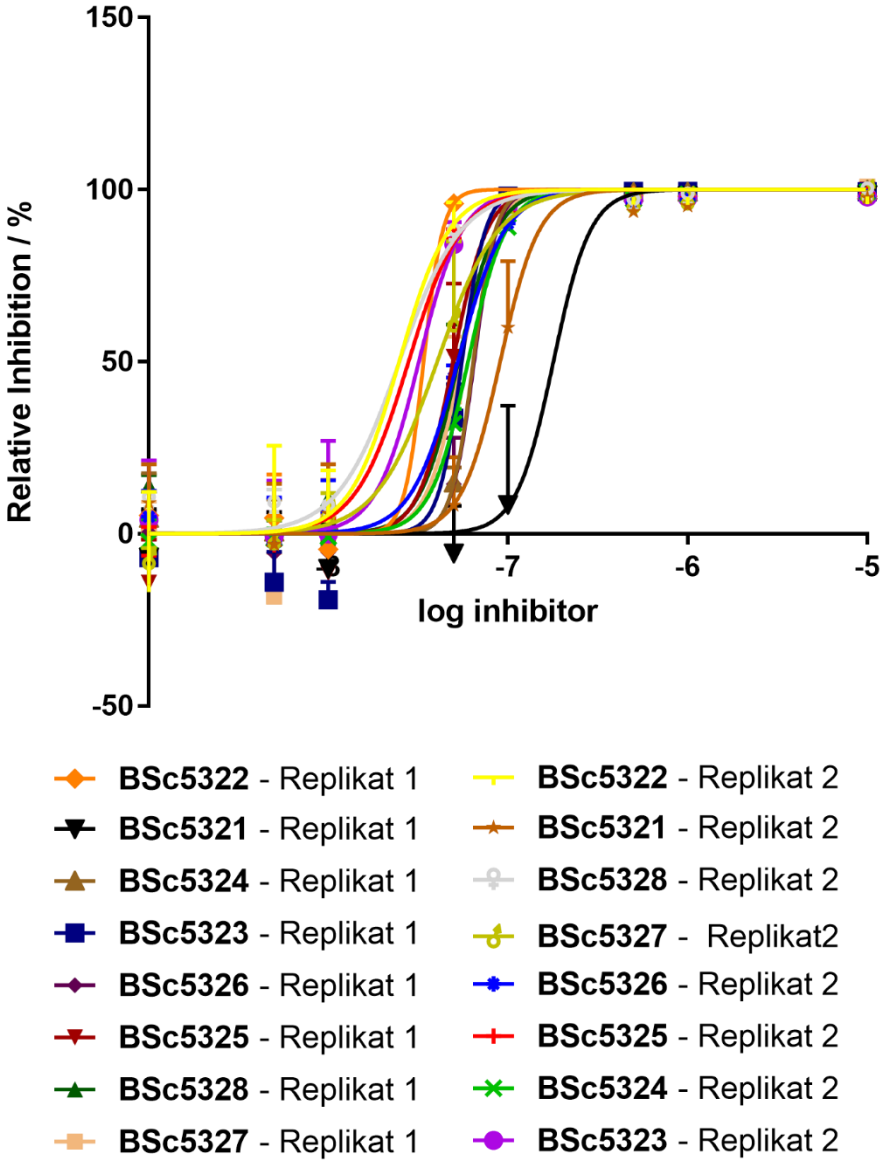


Abbildung 112. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den Proteasom-Inhibitoren **BSc5321** – **BSc5328** durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

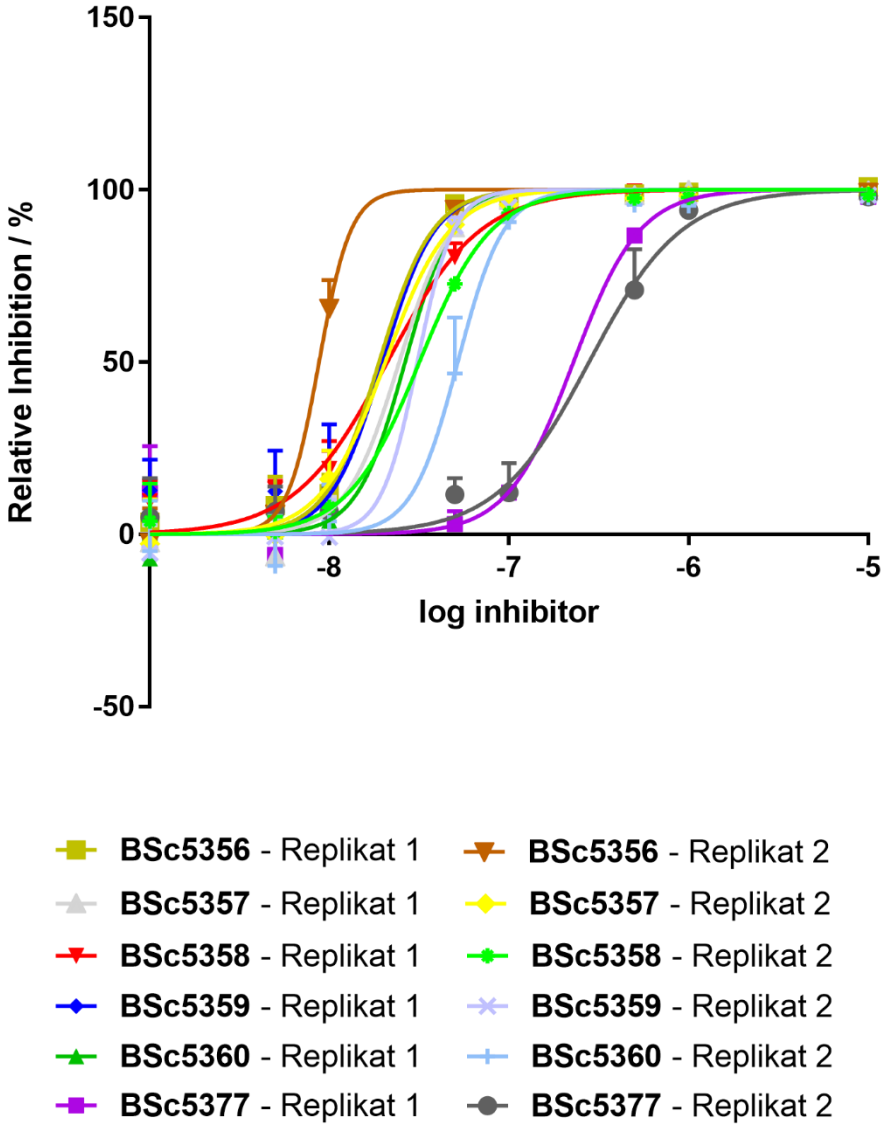


Abbildung 113. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den Proteasom-Inhibitoren **BSc5356** – **BSc5360** und **BSc5377** durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

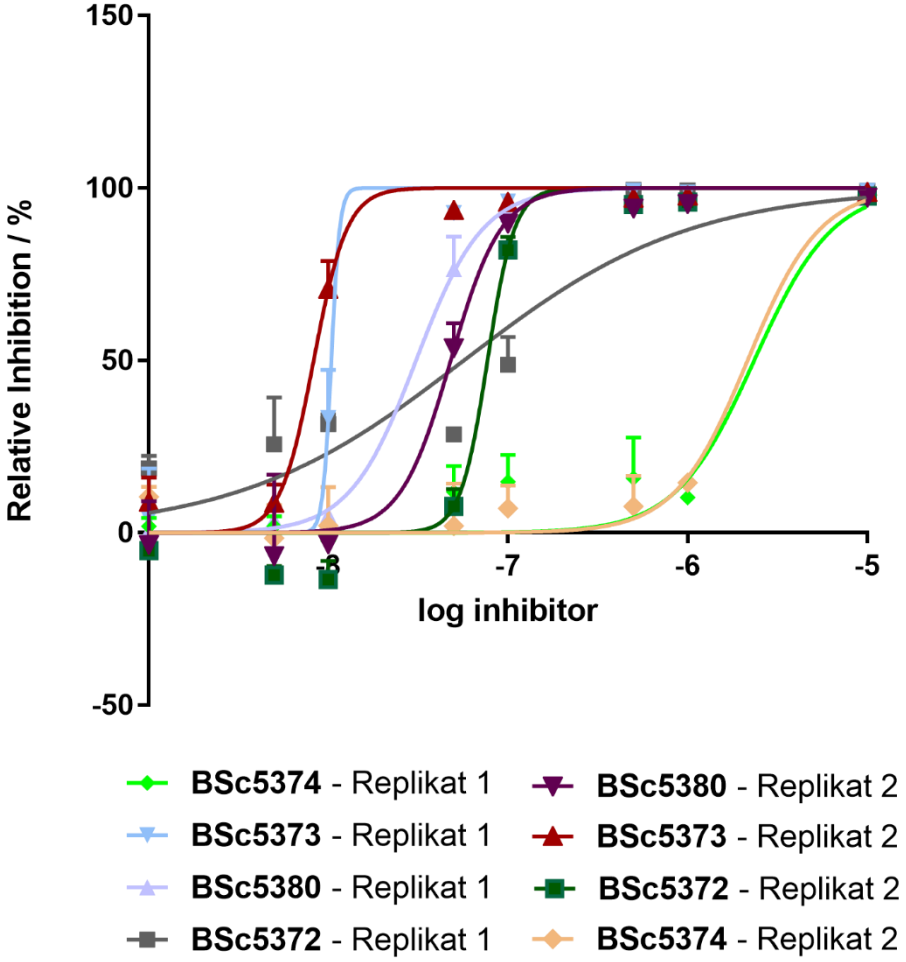


Abbildung 114. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den Proteasom-Inhibitoren **BSc5372** – **BSc5374** und **BSc5380** durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

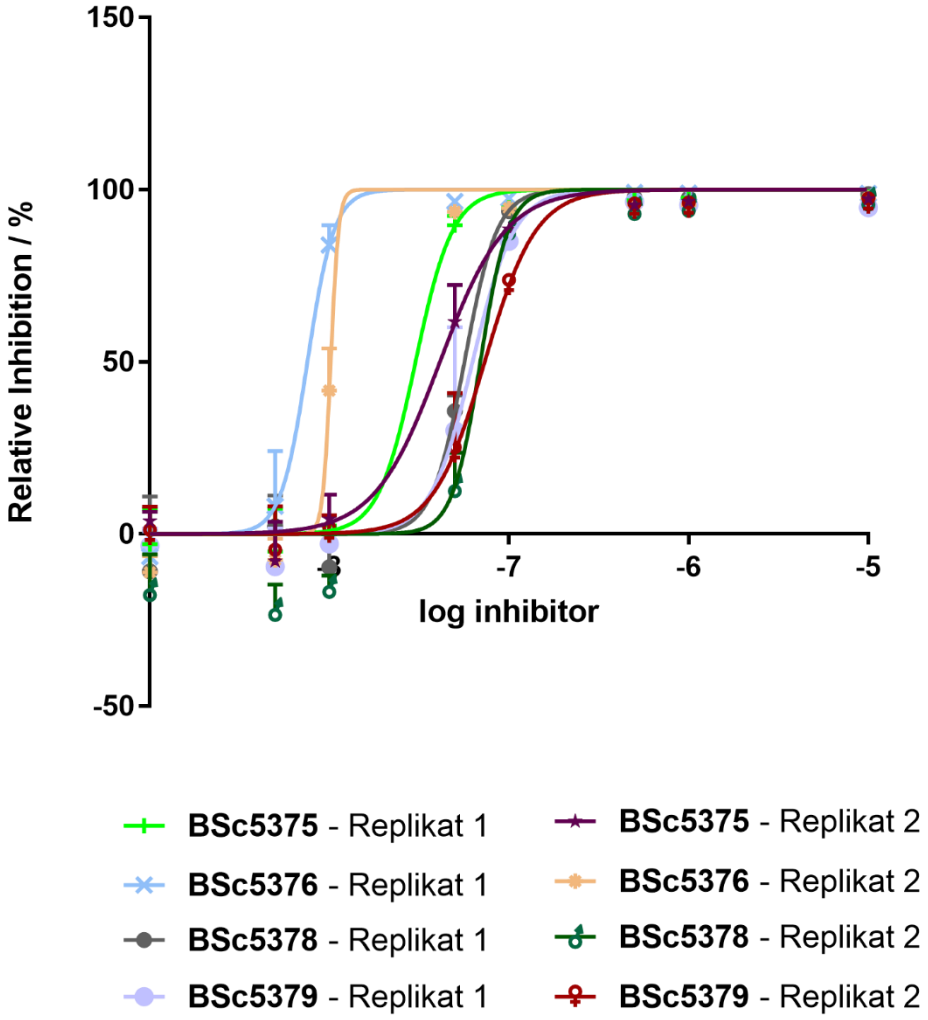


Abbildung 115. Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den Proteasom-Inhibitoren **BSc5375** – **BSc5379** durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

5.3.2.2 Jurkat-Zellen

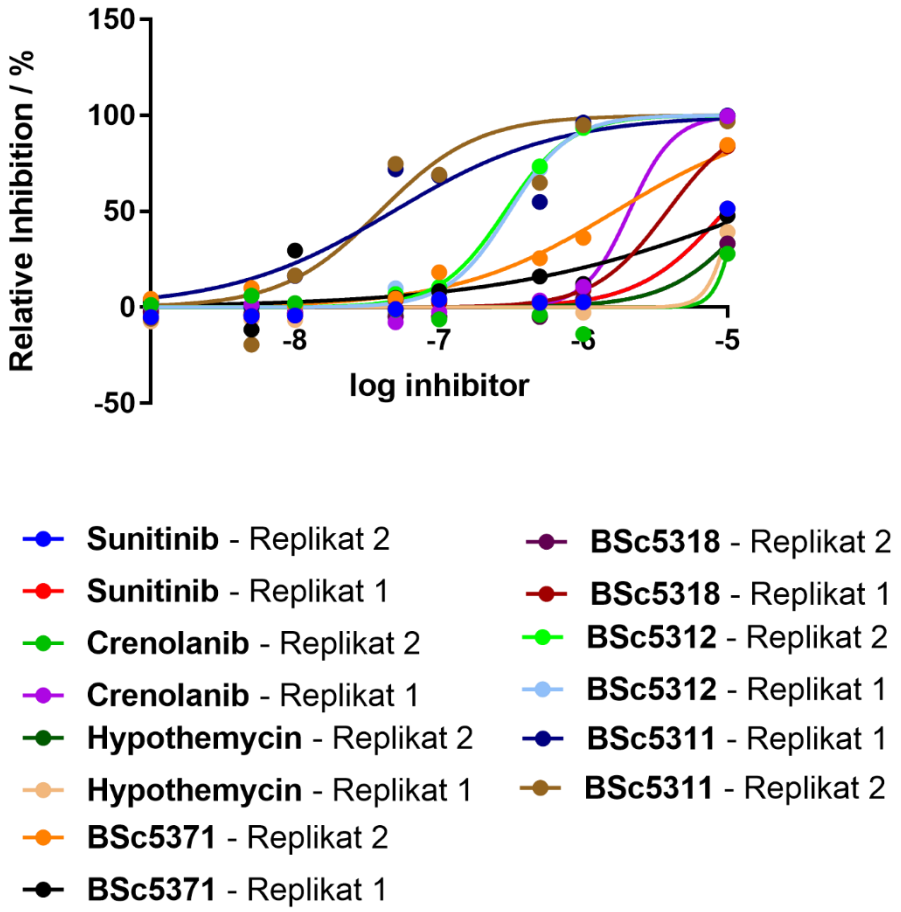


Abbildung 116. Bestimmung der Zellviabilität von Jurkat-Zellen nach Behandlung mit ausgewählten Kinase-Inhibitoren durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

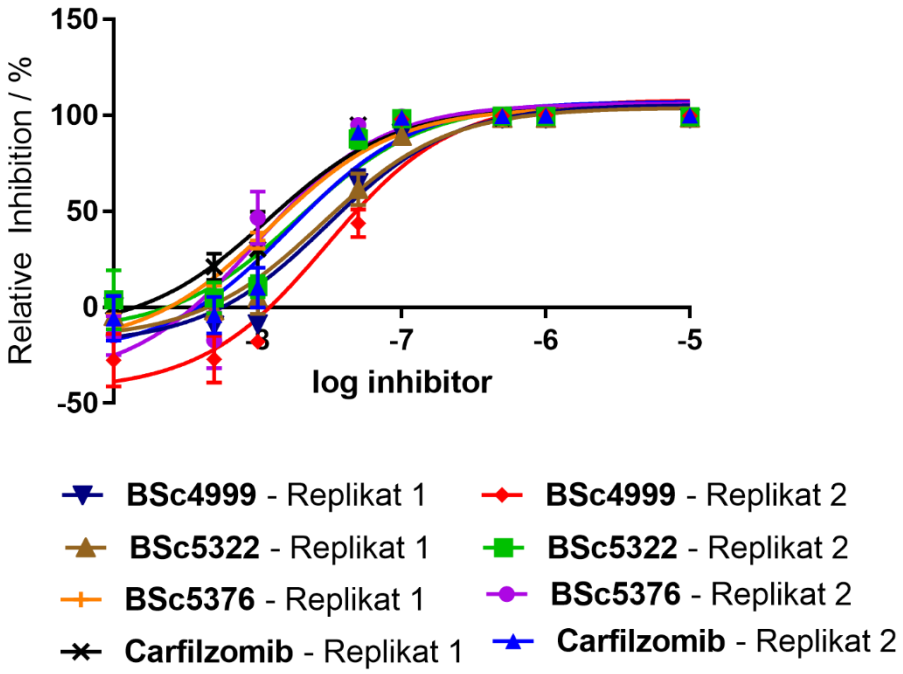


Abbildung 117. Bestimmung der Zellviabilität von Jurkat-Zellen nach Behandlung mit ausgewählten Proteasom-Inhibitoren durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

5.3.2.3 THP1-Zellen

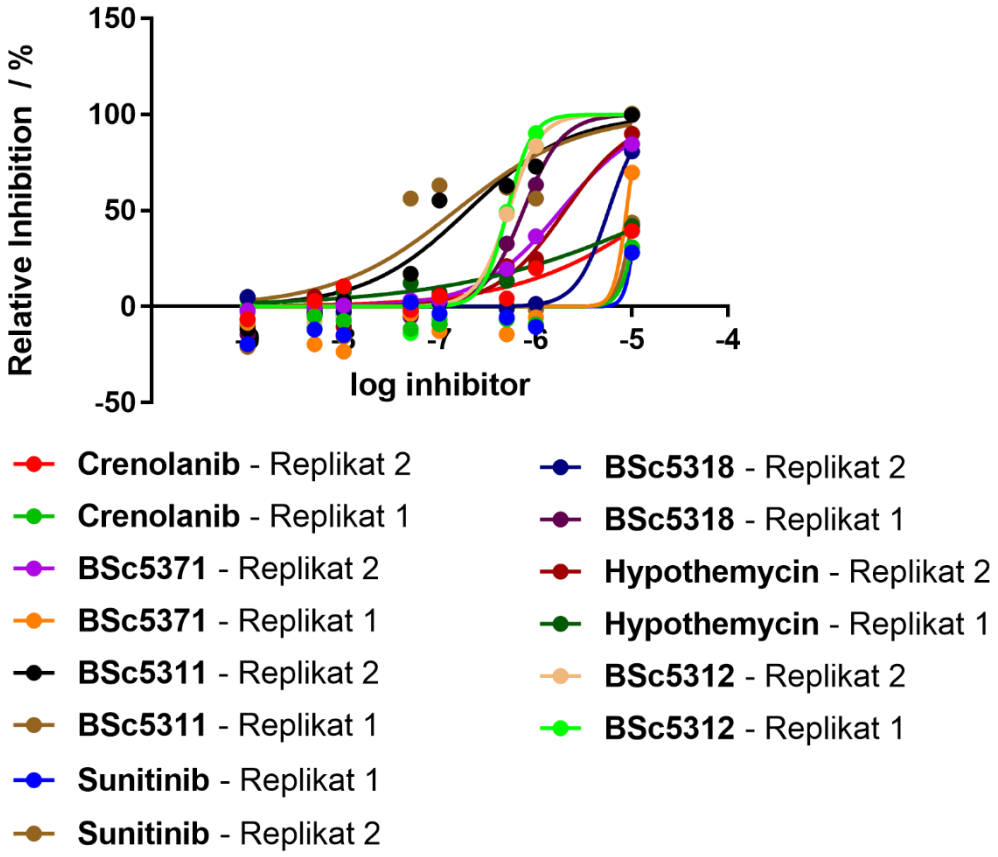


Abbildung 118. Bestimmung der Zellviabilität von THP1-Zellen nach Behandlung mit ausgewählten Kinase-Inhibitoren durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

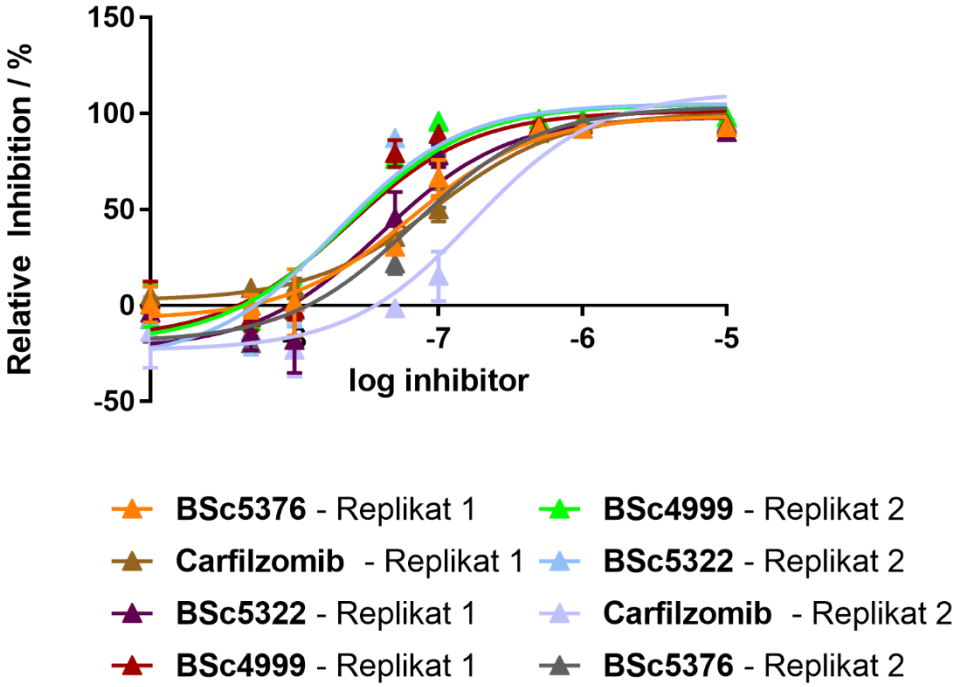


Abbildung 119. Bestimmung der Zellviabilität von THP1-Zellen nach Behandlung mit ausgewählten Proteasom-Inhibitoren durch das fluorometrische Celltiter Blue Assay.

5.3.2.4

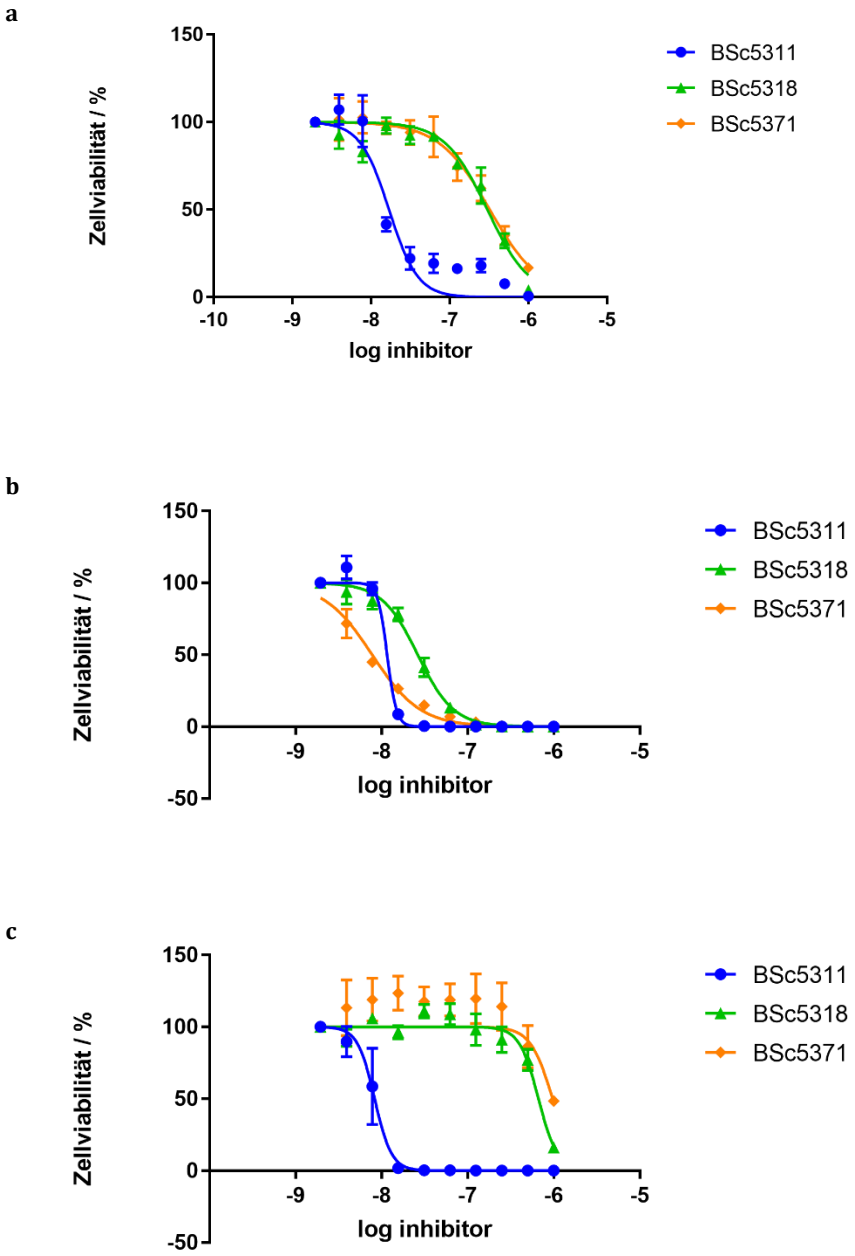


Abbildung 120. Zellviabilität von (a) NOMO1, (b) MOLM14 und (c) U937-Zellen nach Behandlung mit **BSc5311**, **BSc5371** und **BSc5318**.

5.3.2.5 Zeitabhängige Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von FLT3-Inhibitoren in MV4-11 Zellen

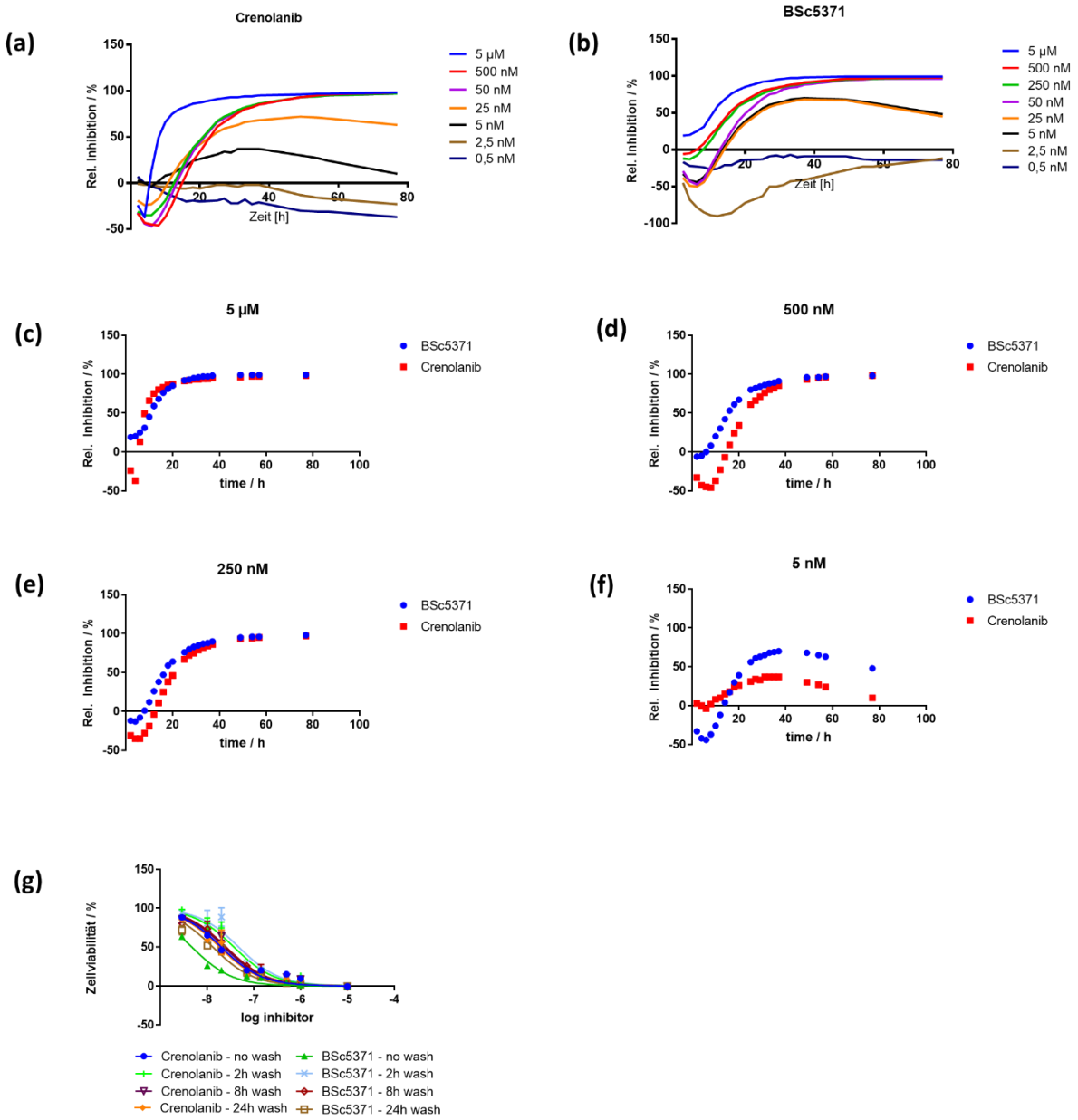


Abbildung 121. Echtzeit-Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit den FLT3-Inhibitoren (a) **Crenolanib** und (b) **BSc5371** mit dem RealTime MT Glo Assay. (c) – (f) Vergleich der Zellviabilität nach Behandlung mit **Crenolanib** (rot) oder **BSc5371** (blau) mit den angegebenen Konzentrationen. (g) Bestimmung der Zellviabilität von MV4-11-Zellen nach Behandlung mit **BSc5371** oder **Crenolanib** für 2 h, 8 h, 4 h, 24 h oder 72 h und anschließendem Medienwechsel. Die. Die Zellviabilität wird in allen Fällen 72 h nach Start der Inkubation mit dem Celltiter Blue Assay bestimmt.

5.3.2.6 Dosis-Wirkungskurven der Bindung von BSc5371 an Therapie-resistente FLT3-Mutationen

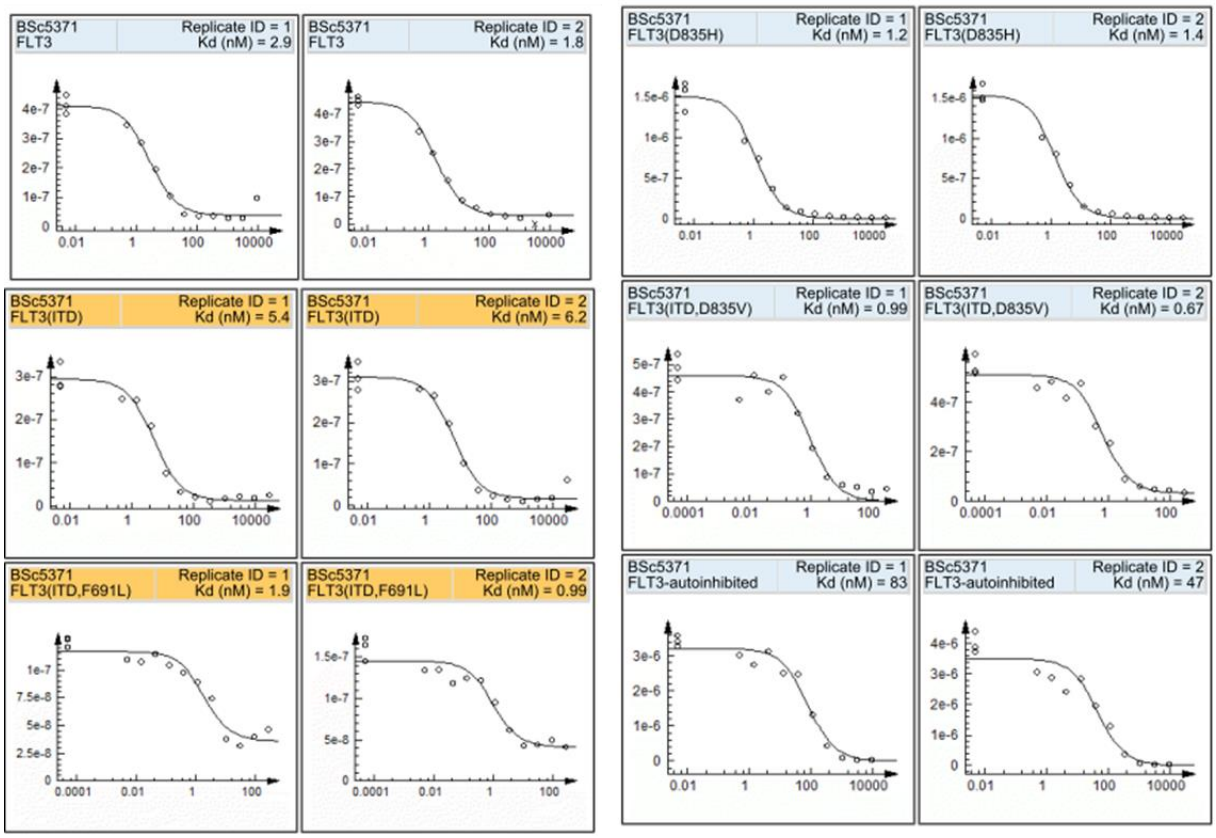


Abbildung 122. Dosis-Wirkungskurven zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Bindung von **BSc5371** an FLT3, autoinhibiertem FLT3, FLT3(ITD), FLT3(D835H), FLT3(ITD,F691L), FLT3(ITD,D835V) durch das KinomeScan Assay (DiscoverX, San Diego, USA).

5.3.2.7 Inhibition der zellulären Umsetzung des Proteasom-Substrats BSc5098

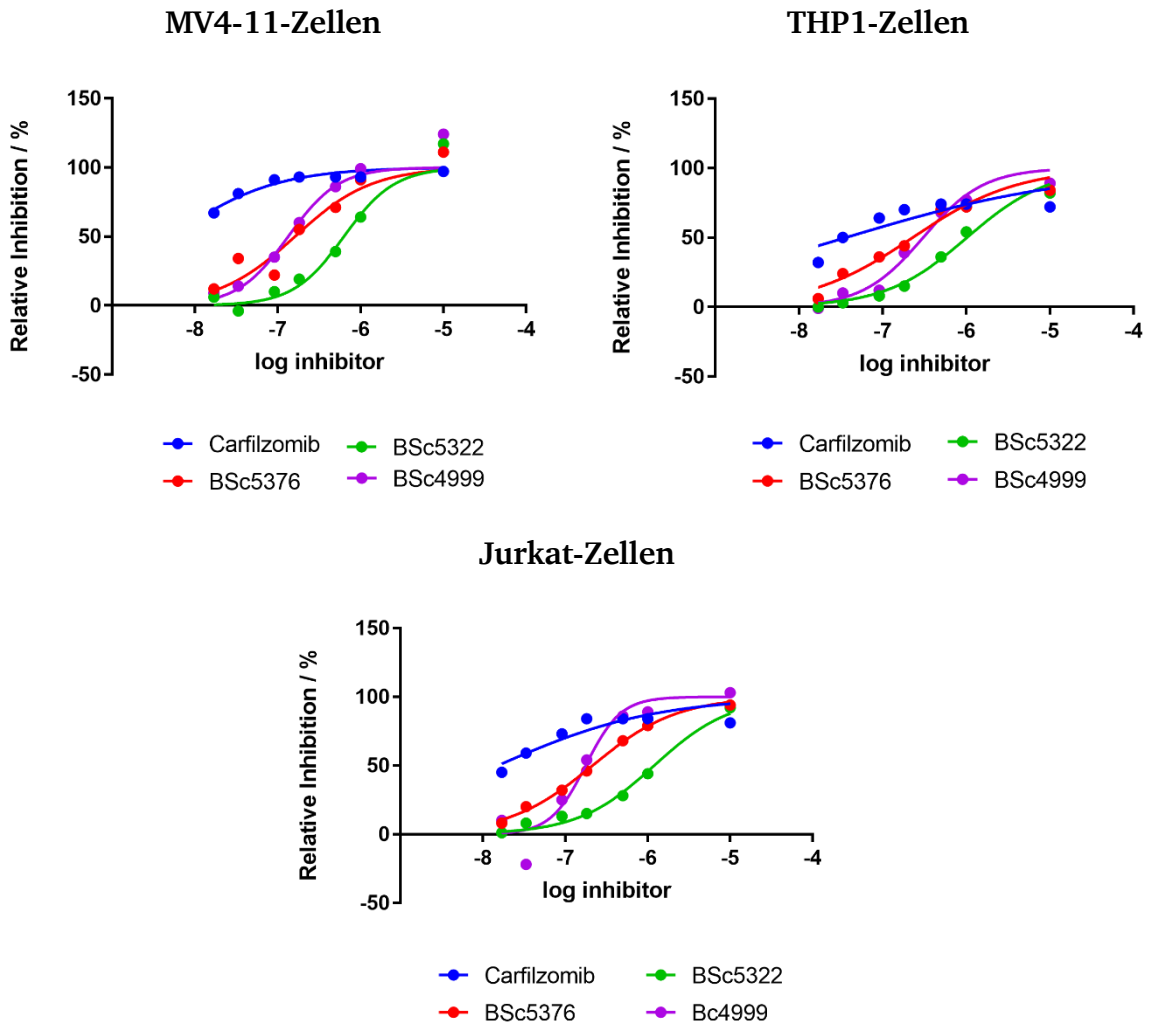


Abbildung 123. Dosis-Wirkungskurven der Inhibition der zellulären Umsetzung des Substratpeptids **BSc5098** (Z-LD(OtBu)A-AMC) durch die Proteasom-Inhibitoren **BSc4999**, **BSc5322**, **BSc5376** und **Carfilzomib** nach 0 h Vorinkubation von Zellen und Inhibitoren.

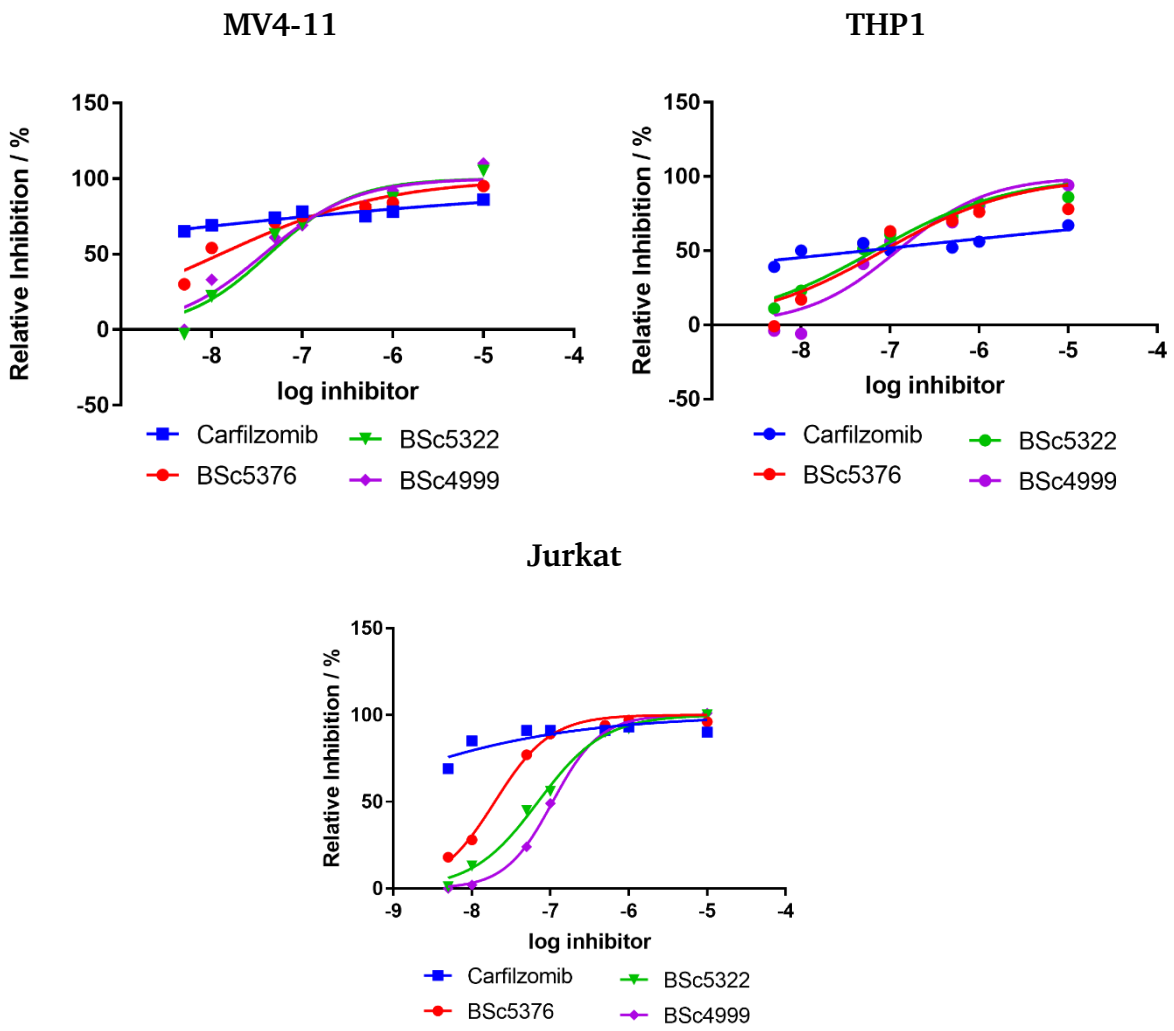


Abbildung 124. Dosis-Wirkungskurven der Inhibition der zellulären Umsetzung des Substratpeptids **BSc5098** (Z-LD(OtBu)A-AMC) durch die Proteasom-Inhibitoren **BSc4999**, **BSc5322**, **BSc5376** und **Carfilzomib** nach 1 h Vorinkubation von Zellen und Inhibitoren.

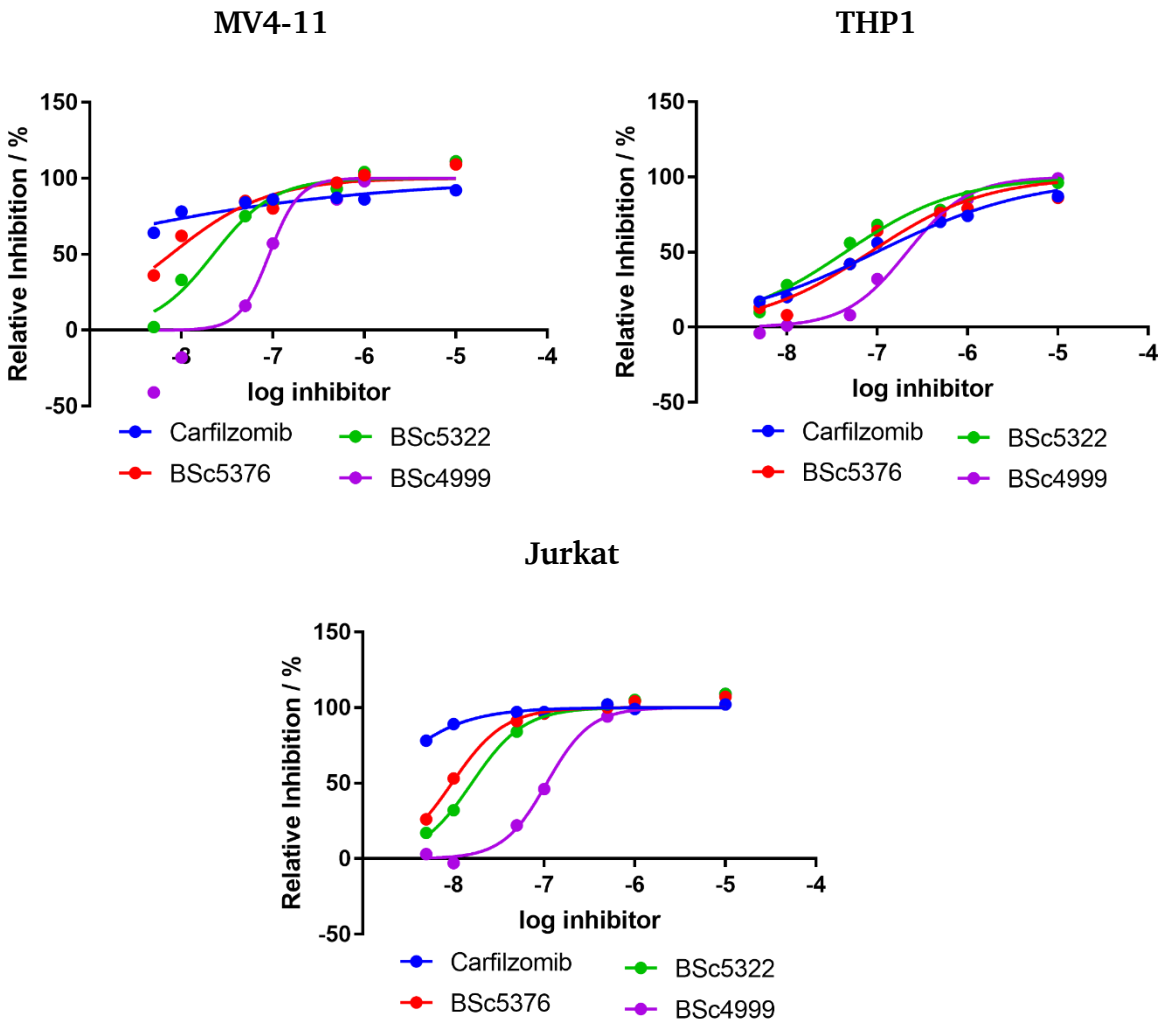


Abbildung 125. Dosis-Wirkungskurven der Inhibition der zellulären Umsetzung des Substratpeptids **BSc5098** (Z-LD(OtBu)A-AMC) durch die Proteasom-Inhibitoren **BSc4999**, **BSc5322**, **BSc5376** und **Carfilzomib** nach 13 h Vorinkubation von Zellen und Inhibitoren.

5.3.3 Charakterisierung fluoreszenter FLT3-Inhibitoren

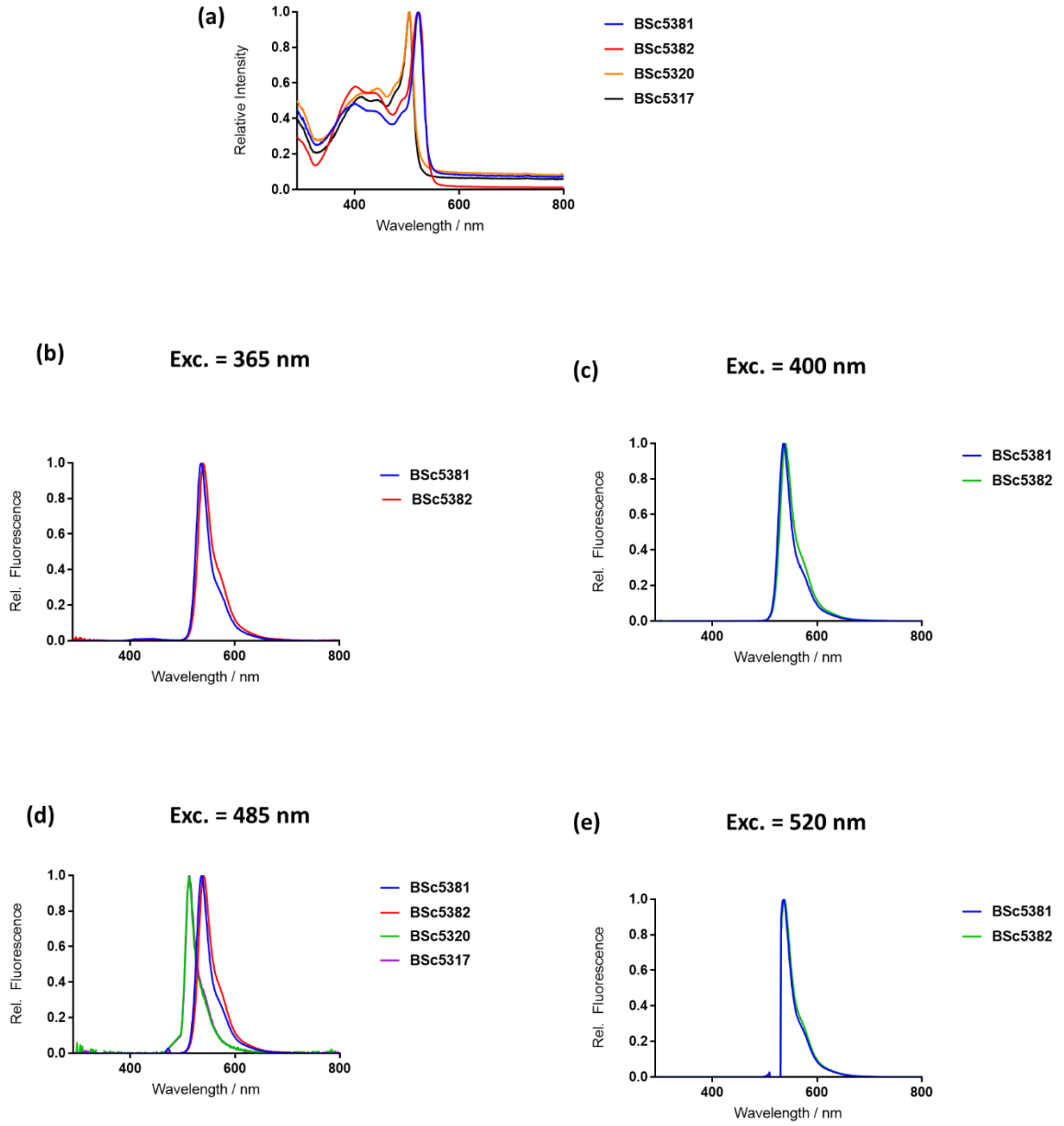
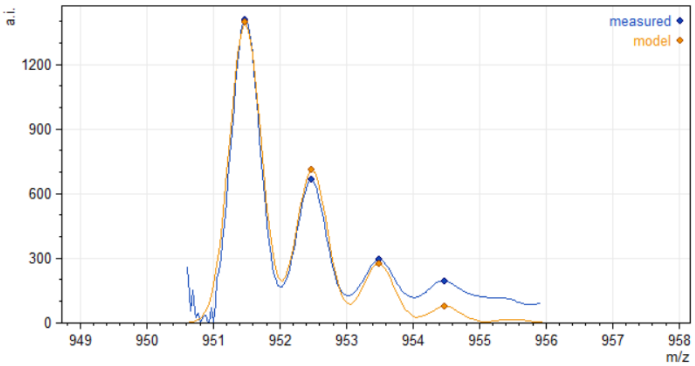


Abbildung 126. (a) Absorptionsspektren von **BSc5381** (blau), **BSc5382** (rot), **BSc5320** (orange) und **BSc5317** (schwarz) im Wellenlängenbereich von 290 nm bis 800 nm. Die Messung wurde in 10 µM ACN mit einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten-Lesegerät und UV-transparenten 96-well-Platten durchgeführt. (b) – (e) Fluoreszenz-Emissionsspektren der BODIPY-markierten FLT3-Inhibitoren bei verschiedenen Anregungswellenlängen. **BSc5320** und **BSc5317** zeigen bei 365 nm, 400 nm und 520 nm nur geringe Emission. Die Messung wurde in 10 µM ACN mit einem Tecan M1000 Mikrotiterplatten-Lesegerät und schwarzen 96-well-Platten durchgeführt.

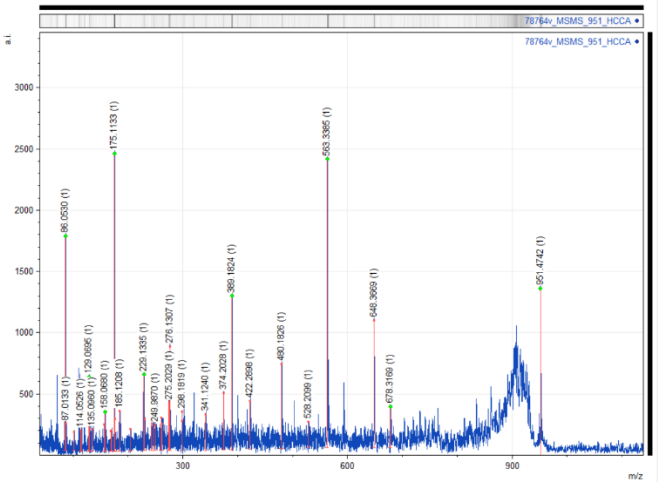
5.3.4 Trypsin-Verdau von FLT3 nach Inkubation mit elektrophilen Molekülen

5.3.4.1 Inkubation mit 2-Iodacetamid

a



b



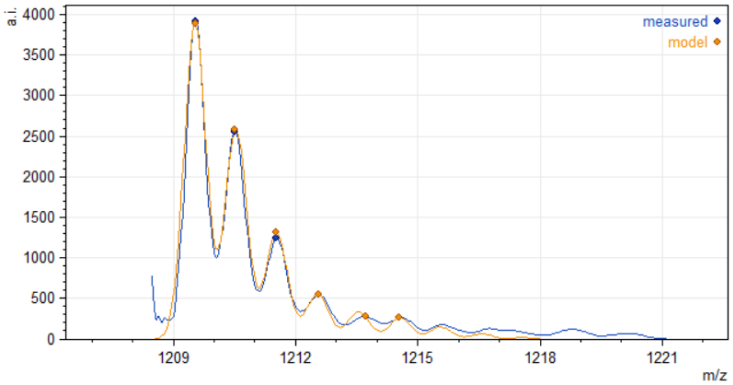
c

ion	slice	m/z	z	sequence	error
b3	[1-3]	389.1489	1	.ICD.f [1xCarbamidomethyl]	0.0335
a2	[1-2]	246.1271	1	.IC.d [1xCarbamidomethyl]	0.0308
b2	[1-2]	274.1220	1	.IC.d [1xCarbamidomethyl]	0.0266
y5	[4-8]	563.3300	1	d.FGLAR.	0.0085
y2 -NH3	[7-8]	229.1295	1	l.AR.	0.0040
M	[1-8]	951.4717	1	.ICDFGLAR. [1xCarbamidomethyl]	0.0025
y2	[7-8]	246.1561	1	l.AR.	0.0018
y1	[8-8]	175.1190	1	a.R.	-0.0056
a6	[1-6]	678.3280	1	.ICDFGL.a [1xCarbamidomethyl]	-0.0110
y1 -NH3	[8-8]	158.0924	1	a.R.	-0.0244
y6	[3-8]	678.3570	1	c.DFGLAR.	-0.0400
im6	[6-6]	86.0964	1	g.L.a	-0.0434
im1	[1-1]	86.0964	1	.I.c	-0.0434
im8	[8-8]	129.1135	1	a.R.	-0.0440

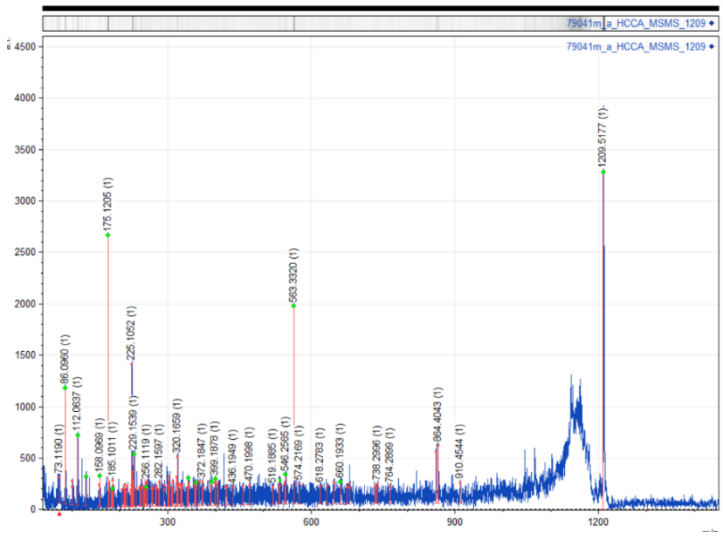
Abbildung 127. (a) Modelliertes (orange) und gemessenes (blau) Isotopenmuster der modifizierten Peptidsequenz IC^{828}DFGLAR ($C_{41}H_{66}N_{12}O_{12}S$) als $[M+H]^+$-Molekülionenpeak. Kalkulierte monoisotopische Masse: m/z = 951.4717. Gemessene monoisotopische Masse: m/z = 951.4742. Fehler: 0.0025 Da. (b) MS/MS-Spektrum der modifizierten Peptidsequenz und (c) Zuordnung der Signale. Die Auswertung erfolgte mit Mmass 5.

5.3.4.2 Inkubation mit BSc5234

a



b



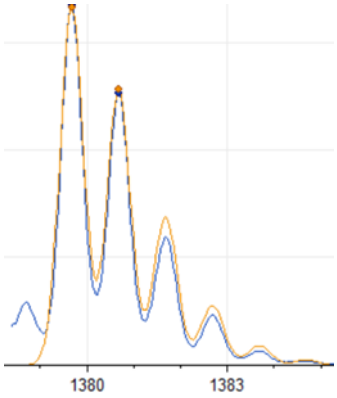
c

ion	slice	m/z	z	sequence	error
b2	[1-2]	532.1683	1	.IC.d [1xBSc5234]	0.0689
im2	[2-2]	391.0893	1	i.C.d [1xBSc5234]	0.0371
y2 -NH3	[7-8]	229.1295	1	l.AR.	0.0244
im8	[8-8]	129.1135	1	a.R.	0.0057
y1 -NH3	[8-8]	158.0924	1	a.R.	0.0045
y5	[4-8]	563.3300	1	d.FGLAR.	0.0020
y1	[8-8]	175.1190	1	a.R.	0.0016
y2	[7-8]	246.1561	1	l.AR.	0.0003
y3 -NH3	[6-8]	342.2136	1	g.LAR.	0.0002
M	[1-8]	1209.5180	1	.ICDFGLAR. [1xBSc5234]	-0.0002
im6	[6-6]	86.0964	1	g.L.a	-0.0005
im1	[1-1]	86.0964	1	.I.c	-0.0005
x2 -NH3	[7-8]	255.1088	1	l.AR.	-0.0074
x1 -NH3	[8-8]	184.0717	1	a.R.	-0.0182
im8 -NH3	[8-8]	112.0869	1	a.R.	-0.0232
y5 -NH3	[4-8]	546.3035	1	d.FGLAR.	-0.0470
y4 -NH3	[5-8]	399.2350	1	f.GLAR.	-0.0472
y3	[6-8]	359.2401	1	g.LAR.	-0.0831
y6 -H2O	[3-8]	660.3464	1	c.DFGLAR.	-0.1531

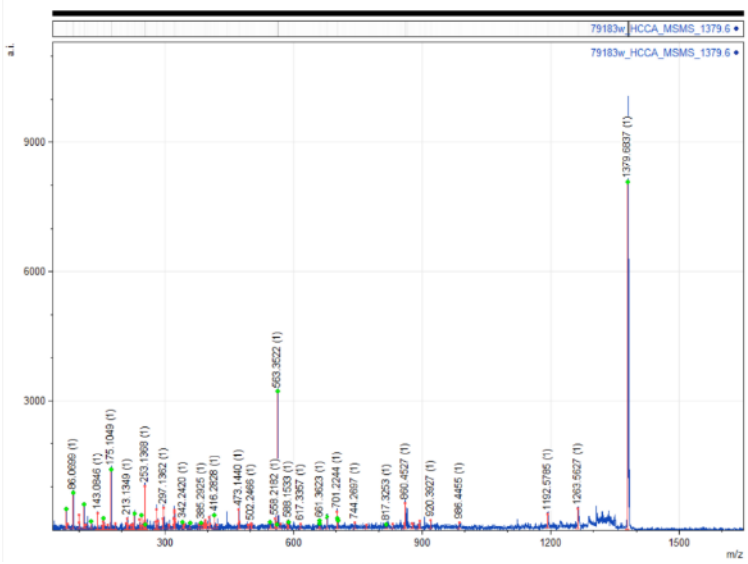
Abbildung 128. (a) Modelliertes (orange) und gemessenes (blau) Isotopenmuster der modifizierten Peptidsequenz IC^{828}DFGLAR ($C_{54}H_{76}N_{14}O_{14}S_2$) als $[M+H]^+$-Molekülionenpeak. Kalkulierte monoisotopische Masse: m/z = 1209.5180. Gemessene monoisotopische Masse: m/z = 1209.5177. Fehler: 0.0003 Da. (b) MS/MS-Spektrum der modifizierten Peptidsequenz und (c) Zuordnung der Signale. Die Auswertung erfolgte mit Mmass 5.

5.3.4.3 Inkubation mit BSc5371

a



b



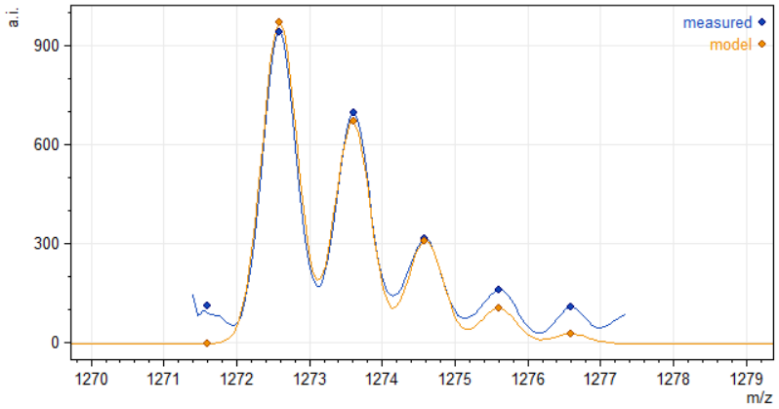
c

ion	slice	m/z	z	sequence	error
im2	[2-2]	561.2312	1	i.C.d [1xBSc5371]	0.1531
x3	[6-8]	385.2194	1	g.LAR.	0.0731
x2 -NH3	[7-8]	255.1088	1	l.AR.	0.0321
y6 -NH3	[3-8]	661.3304	1	c.DFGLAR.	0.0319
y3 -NH3	[6-8]	342.2136	1	g.LAR.	0.0284
y2	[7-8]	246.1561	1	l.AR.	0.0240
M	[1-8]	1379.6599	1	.ICDFGLAR. [1xBSc5371]	0.0238
y5	[4-8]	563.3300	1	d.FGLAR.	0.0222
y4	[5-8]	416.2616	1	f.GLAR.	0.0212
im3 -H2O	[3-3]	70.0287	1	c.D.f	0.0139
y3	[6-8]	359.2401	1	g.LAR.	0.0084
y2 -NH3	[7-8]	229.1295	1	l.AR.	0.0039
y5 -NH3	[4-8]	546.3035	1	d.FGLAR.	0.0019
y1 -NH3	[8-8]	158.0924	1	a.R.	0.0007
y6	[3-8]	678.3570	1	c.DFGLAR.	-0.0062
b3	[1-3]	817.3371	1	.ICD.f [1xBSc5371]	-0.0118
y1	[8-8]	175.1190	1	a.R.	-0.0140
im8 -NH3	[8-8]	112.0869	1	a.R.	-0.0146
x6	[3-8]	704.3362	1	c.DFGLAR.	-0.0208
im6	[6-6]	86.0964	1	g.L.a	-0.0265
im1	[1-1]	86.0964	1	.I.c	-0.0265
y6 -H2O	[3-8]	660.3464	1	c.DFGLAR.	-0.0372
im8	[8-8]	129.1135	1	a.R.	-0.0470
x5	[4-8]	589.3093	1	d.FGLAR.	-0.1133
b2	[1-2]	702.3102	1	.IC.d [1xBSc5371]	-0.1205

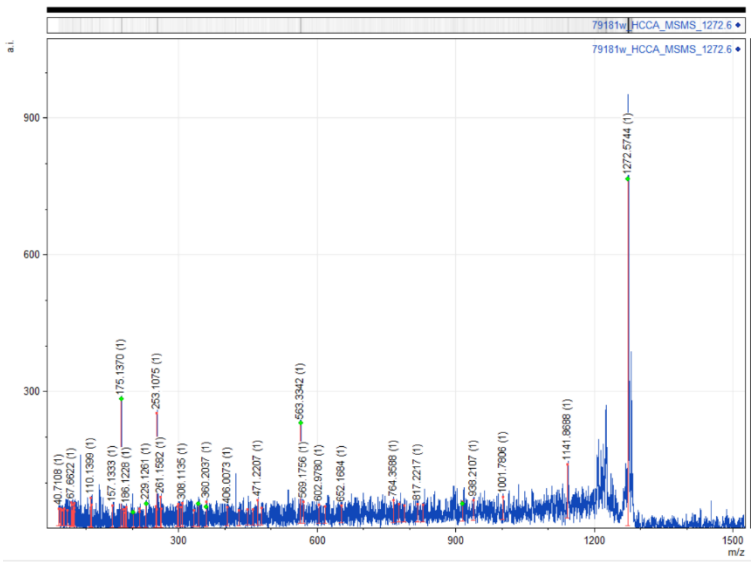
Abbildung 129. (a) Modelliertes (orange) und gemessenes (blau) Isotopenmuster der modifizierten Peptidsequenz IC^{828}DFGLAR ($C_{63}H_{94}N_{16}O_{15}S_2$) als $[M+H]^+$-Molekülionenpeak. Kalkulierte monoisotopische Masse: m/z = 1379.6599. Gemessene monoisotopische Masse: m/z = 1379.6837. Fehler: 0.0238 Da. (b) MS/MS-Spektrum der modifizierten Peptidsequenz und (c) Zuordnung der Signale. Die Auswertung erfolgte mit Mmass 5.

5.3.4.4 Inkubation mit Hypothemycin

a



b



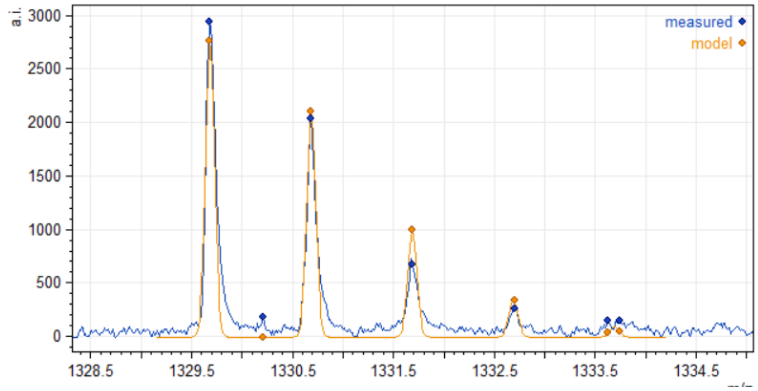
c

ion	slice	m/z	z	sequence	error
y3 -NH3	[6-8]	342.2136	1	g.LAR.	0.0208
y1	[8-8]	175.1190	1	a.R.	0.0181
b5	[1-5]	914.3488	1	.ICDFG.I [1xHypothemycine]	0.0170
y5	[4-8]	563.3300	1	d.FGLAR.	0.0042
x1	[8-8]	201.0982	1	a.R.	0.0029
y2 -NH3	[7-8]	229.1295	1	LAR.	-0.0035
M	[1-8]	1272.5817	1	.ICDFGLAR. [1xHypothemycine]	-0.0073
y3	[6-8]	359.2401	1	g.LAR.	-0.0522

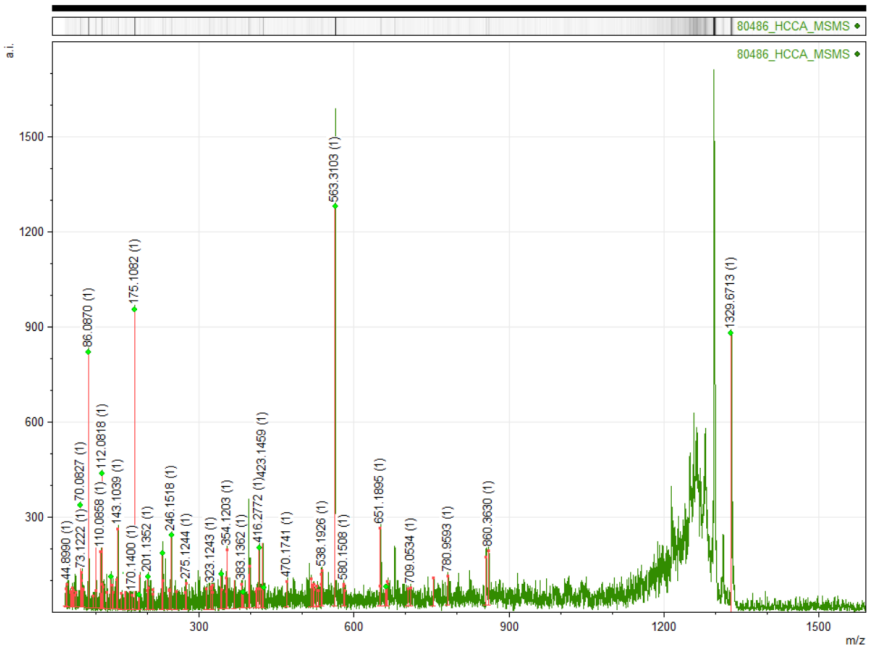
Abbildung 130. (a) Modelliertes (orange) und gemessenes (blau) Isotopenmuster der modifizierten Peptidsequenz IC^{828}DFGLAR ($C_{58}H_{85}N_{11}O_{19}S$) als $[M+H]^+$-Molekülionenpeak. Kalkulierte monoisotopische Masse: m/z = 1272.5817. Gemessene monoisotopische Masse: m/z = 1272.5744. Fehler: 0.0073 Da. (b) MS/MS-Spektrum der modifizierten Peptidsequenz und (c) Zuordnung der Signale. Die Auswertung erfolgte mit Mmass 5.

5.3.4.5 Inkubation mit BSc5318

a



b



c

ion	slice	m/z	z	sequence	error
x3	[6-8]	385.2194	1	g.LAR.	-0.1558
im8	[8-8]	129.1135	1	a.R.	-0.0469
x4 -NH3	[5-8]	425.2143	1	f.GLAR.	-0.0385
y3 -NH3	[6-8]	342.2136	1	g.LAR.	-0.0268
y5	[4-8]	563.3300	1	d.FGLAR.	-0.0198
y1	[8-8]	175.1190	1	a.R.	-0.0107
im1	[1-1]	86.0964	1	.I.c	-0.0095
im6	[6-6]	86.0964	1	g.L.a	-0.0095
M	[1-8]	1329.6772	1	.ICDFGLAR. [1xBSc5318]	-0.0059
x1 -NH3	[8-8]	184.0717	1	a.R.	-0.0052
im8 -NH3	[8-8]	112.0869	1	a.R.	-0.0052
y2	[7-8]	246.1561	1	LAR.	-0.0043
y2 -NH3	[7-8]	229.1295	1	LAR.	-0.0030
y4	[5-8]	416.2616	1	f.GLAR.	0.0156
y1 -NH3	[8-8]	158.0924	1	a.R.	0.0245
x1	[8-8]	201.0982	1	a.R.	0.0370
im3 -H2O	[3-3]	70.0287	1	c.D.f	0.0540
y6 -NH3	[3-8]	661.3304	1	c.DFGLAR.	0.0541

Abbildung 131. (a) Modelliertes (orange) und gemessenes (blau) Isotopenmuster der modifizierten Peptidsequenz IC^{828}DFGLAR ($C_{63}H_{92}N_{16}O_{14}S$) als $[M+H]^+$-Molekülionenpeak. Kalkulierte monoisotopische Masse: m/z = 1329.6772. Gemessene monoisotopische Masse: m/z = 1329.6713. Fehler: 0.0059 Da. (b) MS/MS-Spektrum der modifizierten Peptidsequenz und (c) Zuordnung der Signale. Die Auswertung erfolgte mit Mmass 5.

5.3.5 *Danio rerio* Embryo Toxizitätsassay

Tabelle 15. Bestimmung der Toxizität verschiedener Kinase-Inhibitoren in *Danio rerio* Wildtyp Embryonen.

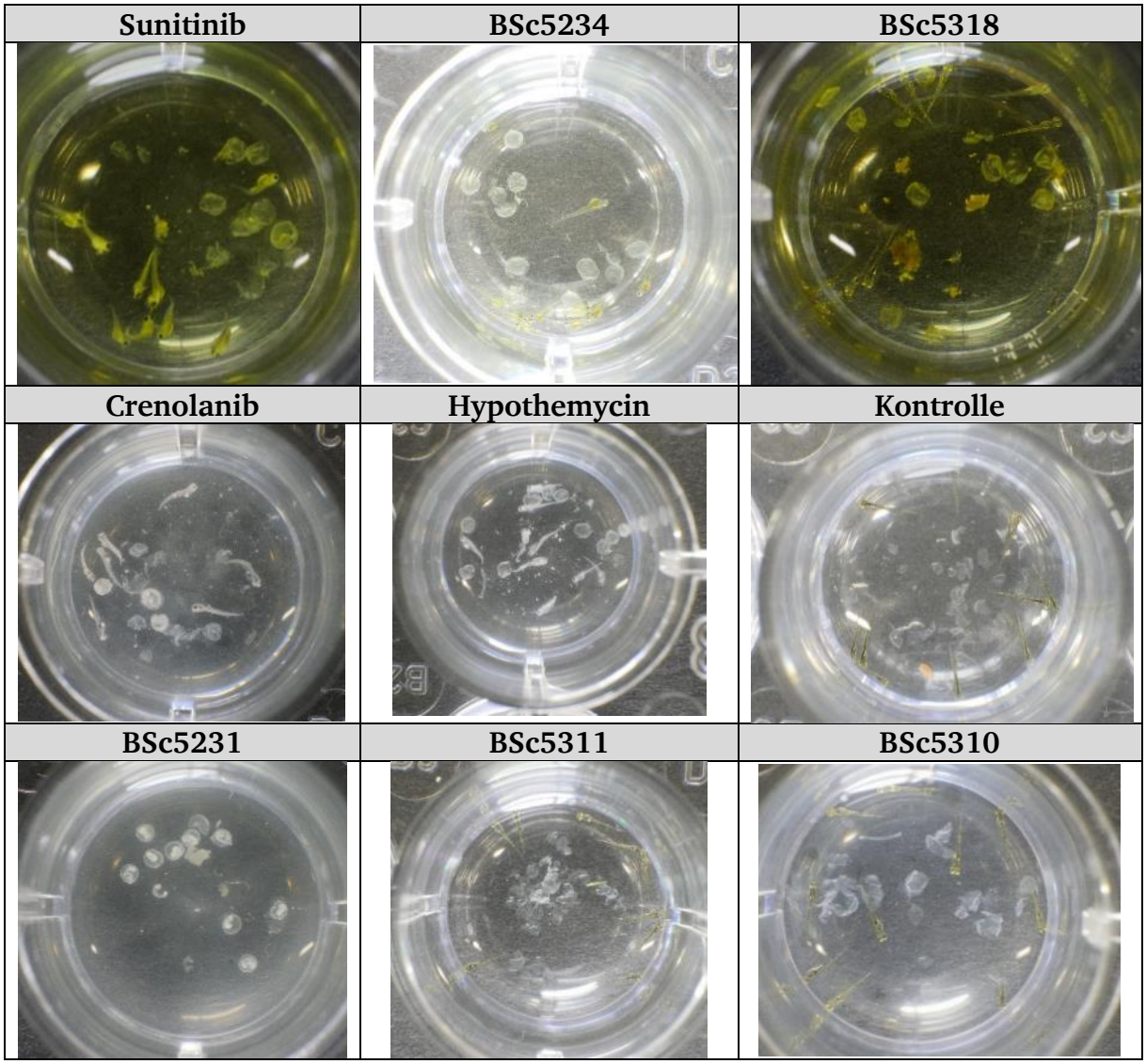
Verbindung	Konzentration	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
BSc5232	50 μM	100 %	100 %	0 %	0 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5237	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5315	50 μM	100 %	0 %	0 %	0 %
	10 μM	100 %	0 %	0 %	0 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5316	50 μM	0 %	0 %	0 %	0 %
	10 μM	50%±10%	0 %	0 %	0 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
Sunitinib	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %(1)
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5317	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5318	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %(1)
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5319	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5320	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5231	50 μM	0%	0%	0%	0%
	10 μM	100 %	100 %	0%	0%(1)
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5309	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5310	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5311	50 μM	0%	0%	0%	0%
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %(1)
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5312	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %(1)
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
Hypothemycin	50 μM	100 %	100 %	100 %	0 %(1)
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
Crenolanib	50 μM	100 %	100 %	100 %	0 %(1)
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5234	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %(1)
	5 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5235	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	5 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Compound	Concentration	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
BSc5371	50 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5381	50 μM	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
BSc5382	50 μM	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
	10 μM	100 %	100 %	100 %	100 %
	1 μM	100 %	100 %	100 %	100 %

n.d. = Nicht bestimmt. [1] siehe nachfolgende Tabelle

Tabelle 16. Effekt der Behandlung ausgewählter FLT3-Inhibitoren auf die Entwicklung von *Danio rerio* Embryonen 5 dpf.



5.3.6 Z'-Faktoren des zellbasierten Proteasom-Assays

Kapitel 3.2.2 - Abbildung 66 - Variation Zellzahl und Substratkonzentration

BSc5098										
Experiment	c	Steigung / rfu / sec			MW	SD	Threshold	S	R	Z'
50k cells	100 µM	0,9412281	0,8526316	1	0,9561	0,0911	0,6827	1,5573	1,9619	0,794
10k cells		-0,70789474	-0,34105263	0	-0,4691	0,1690	-0,9761	-0,1015	0,5367	-0,189
1k cells		-1,07210526	-0,85298246	-1	-0,9331	0,0987	-1,2291	-0,3545	0,0727	-4,873
50k cells	25 µM	1,44140351	1,64736842	2	1,5837	0,1008	1,2813	1,2998	1,8050	0,720
10k cells		0,2154386	0,20929825	0	0,0574	0,2191	-0,6000	-0,5815	0,2787	-2,086
1k cells		-0,11877193	-0,10210526	0	-0,1226	0,0185	-0,1782	-0,1598	0,0987	-1,620
NK	100 µM	-1,0677193	-0,974386	-1	-1,0058	0,0438	-0,8746			
NK	25 µM	-0,15333333	-0,19701754	0	-0,2213	0,0676	-0,0185			
Suc-LLVY-AMC										
Experiment	c	Steigung / rfu / sec			MW	SD	Threshold	S	R	Z'
50k cells	100 µM	0,62052632	0,54210526	0,63035088	0,5977	0,0395	0,4792	0,4327	0,5708	0,758
10k cells		0,08017544	0,09385965	0,11035088	0,0948	0,0123	0,0578	0,0113	0,0679	0,166
1k cells		0,02438596	0,01877193	0,00052632	0,0146	0,0102	-0,0160	-0,0625	0,0123	-5,065
50k cells	25 µM	0,2222807	0,16175439	0,17807018	0,1874	0,0256	0,1107	0,0520	0,1694	0,307
10k cells		0,01438596	0,05157895	0,04877193	0,0382	0,0169	-0,0125	-0,0711	0,0202	-3,514
1k cells		0,01298246	0,02210526	-0,14157895	-0,0355	0,0751	-0,2608	-0,3194	0,0535	-5,970
NK	100 µM	0,02842105	0,03403509	0,01824561	0,0269	0,0065	0,0465			
NK	25 µM	0	0,03263158	0,02140351	0,0180	0,0135	0,0586			

Abbildung 3.2.2 - Abbildung 67 - Variation Zelllinie und Substratkonzentration

BSc5098										
Experiment	c	Steigung / rfu / sec			MW	SD	Threshold	S	R	Z'
MV4-11	100 µM	0,87676756	0,90342532	0,98555074	0,92191454	0,04629495	0,783029694	0,873553991	1,06079443	0,823
	50 µM	0,7780251	0,81462467	0,77625026	0,78963335	0,01768639	0,736574188	0,991799763	1,08458919	0,914
	33.3 µM	0,84400323	0,79636399	0,77285564	0,80440762	0,02959752	0,715615066	0,832722818	0,92760882	0,898
	25 µM	0,81220049	0,80135643	0,79494433	0,80283375	0,00712183	0,781468271	0,886261938	0,92085118	0,962
Jurkat	100 µM	1,8322914	1,75818249	1,7445809	1,7783516	0,03854329	1,662721729	1,753246026	1,91723148	0,914
	50 µM	1,91258597	1,70813702	1,66666949	1,76246416	0,10749359	1,439983393	1,695208969	2,05742	0,824
	33.3 µM	1,84549318	1,84540868	1,77496692	1,82195626	0,0332265	1,722276763	1,839384515	1,94515745	0,946
	25 µM	1,76869087	1,87200132	1,66800031	1,76956417	0,08328535	1,519708105	1,624501772	1,8875816	0,861
THP-1	100 µM	0,89441093	0,85897272	0,79037776	0,84792047	0,04318441	0,718367252	0,80889155	0,98680035	0,820
	50 µM	0,84446562	0,79406888	0,7746183	0,80438427	0,02943317	0,716084744	0,971310319	1,09934011	0,884
	33.3 µM	0,88188421	0,84562573	0,84174481	0,85641825	0,01807672	0,802188099	0,919295851	0,97961945	0,938
	25 µM	0,82151614	0,88354964	0,92909696	0,87805425	0,04409125	0,745780494	0,850574161	0,99607168	0,854
NK	100 µM	-0,11870534	-0,13977742	-0,1581569	-0,13887988	0,01611853	-0,0905243	-	-	
	50 µM	-0,29740938	-0,3098091	-0,27764904	-0,29495584	0,01324342	-0,25522558	-	-	
	33.3 µM	-0,12605987	-0,12201544	-0,12152828	-0,1232012	0,00203115	-0,11710775	-	-	
	25 µM	-0,12022545	-0,11186484	-0,12196199	-0,11801743	0,00440792	-0,10479367	-	-	

Abbildung 70 - Bestimmung der zellulären Proteasom-Inhibition

BSc5098										
Inkubationszeit	Zelllinie	Steigung / rfu / sec			MW	SD	Threshold	S	R	Z'
0 h	MV4-11	0,72302814	0,75963761	0,7756243	0,75276335	0,02201561	0,686716514	0,663878498	0,85269523	0,779
	Jurkat	1,08704322	1,07644641	1,16341578	1,10896847	0,03874235	0,992741413	1,272328679	1,43420722	0,887
	THP-1	0,54204136	0,52354568	0,52601087	0,53053263	0,00819989	0,505932961	0,668417098	0,70169505	0,953
	NK MV4-11	-0,09558879	-0,1520827	-0,05212415	-0,09993188	0,0409233	0,022838016	-	-	-
	NK Jurkat	-0,307856	-0,32294273	-0,34491753	-0,32523875	0,01521716	-0,27958727	-	-	-
	NK THP-1	-0,16991094	-0,17516121	-0,16841511	-0,17116242	0,00289276	-0,16248414	-	-	-
1 h	MV4-11	0,454	0,430	0,421	0,43504123	0,01404532	0,392905259	0,563116409	0,62999123	0,894
	Jurkat	1,403	1,302	1,323	1,3426936	0,04319925	1,213095854	1,254602377	1,63400958	0,768
	THP-1	0,700	0,733	0,706	0,71313601	0,01435207	0,670079792	0,85844154	0,92774525	0,925
	NK MV4-11	-0,194	-0,205	-0,185	-0,19495	0,00824628	-0,17021115	-	-	-
	NK Jurkat	-0,340	-0,174	-0,360	-0,29131598	0,08326982	-0,04150652	-	-	-
	NK THP-1	-0,202	-0,221	-0,221	-0,21460924	0,00874916	-0,18836175	-	-	-
13 h	MV4-11	0,684	0,656	0,619	0,65298976	0,02670381	0,572878338	0,660102826	0,77715987	0,849
	Jurkat	1,494	1,963	1,815	1,75744577	0,19581617	1,169997261	1,37631287	2,01031487	0,685
	THP-1	0,849	0,903	0,930	0,893787	0,03368268	0,792738967	0,83961034	1,10842674	0,757
	NK MV4-11	-0,128	-0,107	-0,137	-0,12417011	0,01231521	-0,08722449	-	-	-
	NK Jurkat	-0,269	-0,258	-0,232	-0,25286909	0,01551783	-0,20631561	-	-	-
	NK THP-1	-0,152	-0,204	-0,288	-0,21463974	0,05592279	-0,04687137	-	-	-

5.3.7 *Danio rerio* Embryo Fluchtreflex Assay

5.3.7.1 Aufbau des Experiments

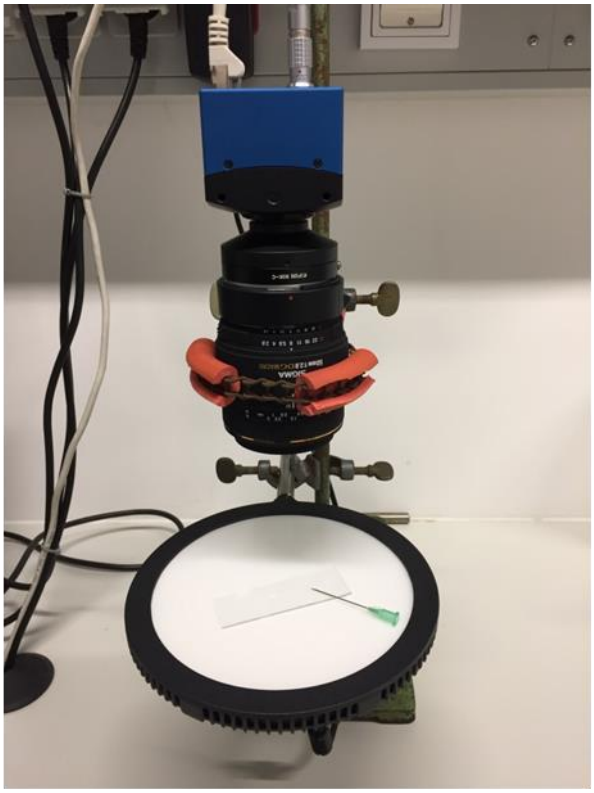


Abbildung 132 Experimenteller Aufbau zur Untersuchung des Fluchtreflexes von Zebrafisch-Embryonen. (Oben) Digitale Highspeed Kamera MotionBlitz EoSens mini1; KIPON Nikon C Adapter; 20 mm Erweiterungsring; Sigma 50 mm F2.8 EX DG Makroobjektiv (55 mm); SL-300 LED Soft Light.

5.3.7.2 Software zur Bestimmung der Bewegungsamplitude

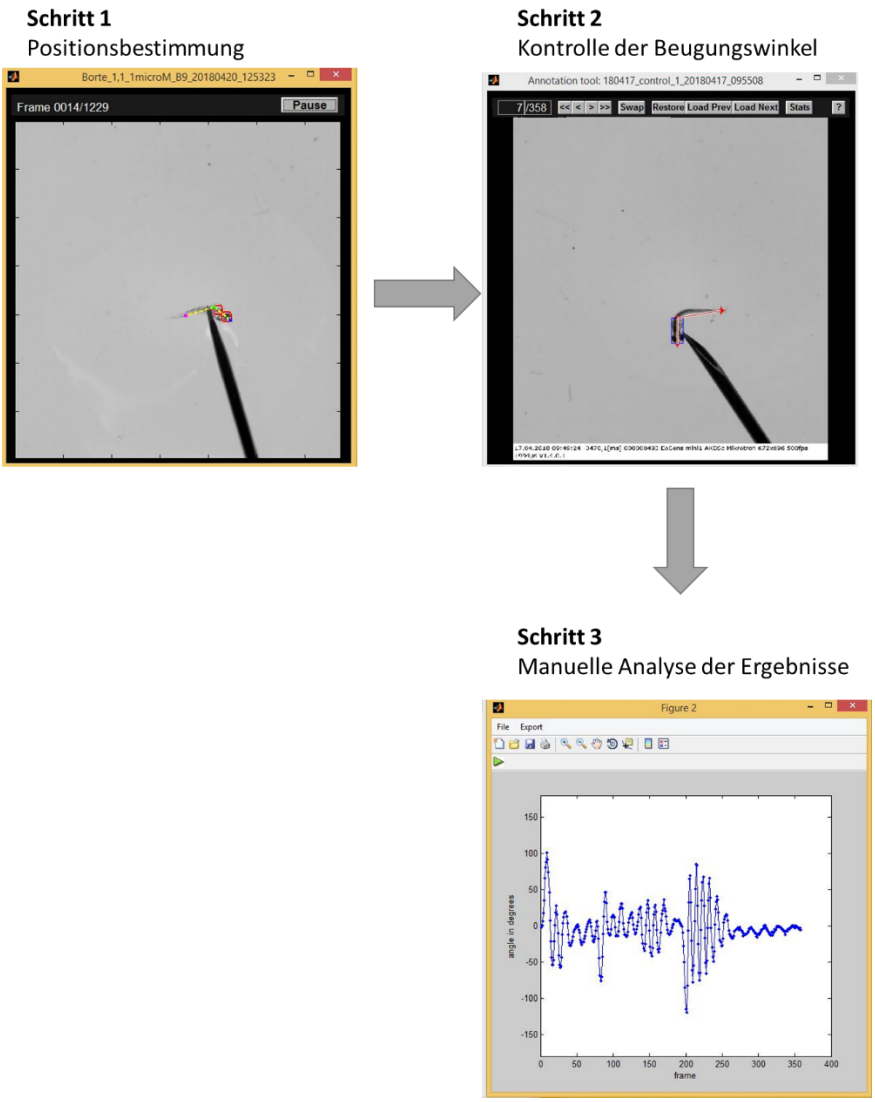


Abbildung 133. Auswertung der Aufnahmen des Fluchtreflexes mit einem MATLAB-basierte Programm (zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Roth, FB Informatik, TU Darmstadt). Im ersten Schritt werden die Positionen der Kopfspitze, des Dottersacks und der Schwanzspitze des Embryo automatisch bestimmt. Im zweiten Schritt können die Positionsbestimmungen kontrolliert und verfeinert werden. Durch die Auftragung der Bewegungsamplitude in Abhängigkeit der Zeit können dann die kinematische Parameter bestimmt werden und eine statistische Analyse durchgeführt werden.

5.3.7.3 Statistische Auswertung des Fluchtreflex-Assays

Tabelle 17. Übersicht über die untersuchten Embryonen je Behandlungsgruppe und Anzahl der Stimuli und Reflexe.

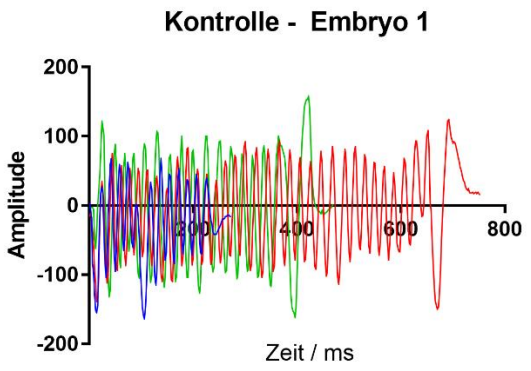
	Konzentration	Inkubations-dauer	Überlebens-rate / % (n = 4)	Anzahl untersuchter Embryonen	Anzahl der Stimuli	Anzahl der Reflexe	Reflexe je Stimulus	Mittelwert
Kontrolle	-	-	100	3	19	9	0,474	0,47
	25 μM	24 h	100	3	100	8	0,080	
Bortezomib	25 μM	48 h	75	3	150	3	0,020	0,03
	50 μM	24 h	100	3	150	0	0,000	
	25 μM	24 h	50	2	6	6	1,000	
BSc5376	50 μM	24 h	75	3	9	9	1,000	0,81
	25 μM	48 h	50	2	11	6	0,545	

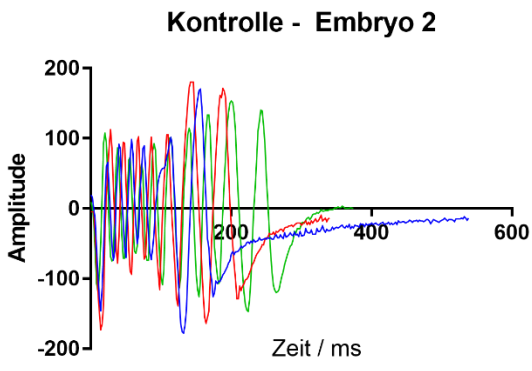
Tabelle 18. Statistische Zusammenfassung der analysierten kinematischen Parameter im Fluchtreflex-Assay. BTZ: Bortezomib; Konz. – Konzentration; *n.s.* – nicht signifikant; *n.a.* – nicht verfügbar; CI – Konfidenzintervall.

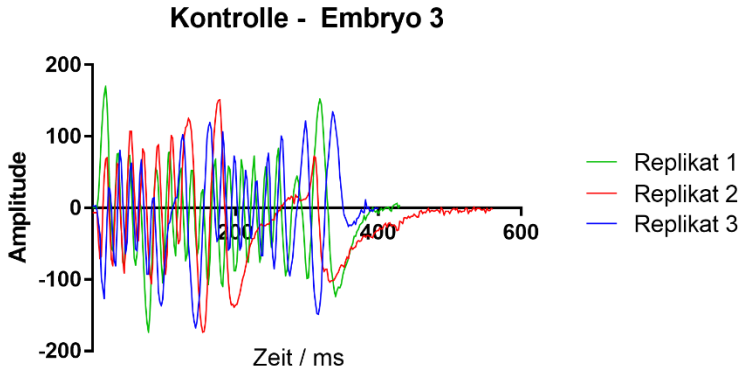
		Konz.	Zeit	Mittelwert	Unterschied zwischen Mittelwerten	95% CI	p-Wert	Interpretation	R^2
Amplitude der *C-Bend*	**Kontrolle**			129 ± 13,26, n=9	n.a.	n.a.	n.a.	*n.a.*	n.a.
	BTZ	**25 µM**	**24 h**	131,6 ± 21,3, n=9	2,556 ± 25,09	-50,64 to 55,75	0,9201	*n.s.*	0,0006479
		25 µM	**48 h**	**6,889 ± 5,549, n=9**	**-122,1 ± 14,37**	**-152,6 to -91,64**	**<0,0001**	********	**0,8185**
		50 µM	**24 h**	**0 ± 0, n=9**	**-129 ± 13,26**	**-157,1 to -100,9**	**<0,0001**	********	**0,8554**
	BSc5376	**25 µM**	**24 h**	126,2 ± 14,05, n=6	-2,833 ± 19,93	-45,88 to 40,21	0,8891	*n.s.*	0,001553
		50 µM	**24 h**	121,7 ± 7,399, n=9	-7,333 ± 15,18	-39,52 to 24,86	0,6357	*n.s.*	0,01437
		25 µM	**48 h**	119,8 ± 6,848, n=6	-9,167 ± 17,34	-46,62 to 28,29	0,6059	*n.s.*	0,02105
Dauer der *C-Bend*	**Kontrolle**			19,67 ± 1,374, n=9	n.a.	n.a.	n.a.	*n.a.*	n.a.
	BTZ	**25 µM**	**24 h**	32,67 ± 6,489, n=9	13 ± 6,633	-1,062 to 27,06	0,0677	*n.s.*	0,1936
		25 µM	**48 h**	8,222 ± 6,654, n=9	-11,44 ± 6,794	-25,85 to 2,959	0,1115	*n.s.*	0,1506
		50 µM	**24 h**	**0 ± 0, n=9**	**-19,67 ± 1,374**	**-22,58 to -16,75**	**<0,0001**	********	**0,9275**
	BSc5376	**25 µM**	**24 h**	**14 ± 0,8165, n=6**	**-5,667 ± 1,826**	**-9,611 to -1,722**	**0,0084**	******	**0,4256**
		50 µM	**24 h**	19,17 ± 2,212, n=6	-0,5 ± 2,458	-5,811 to 4,811	0,842	*n.s.*	0,003172
		25 µM	**48 h**	**15,56 ± 0,5031, n=9**	**-4,111 ± 1,464**	**-7,214 to -1,009**	**0,0126**	*****	**0,3303**
Reflexdauer	**Kontrolle**			390,7 ± 50,72, n=9	n.a.	n.a.	n.a.	*n.a.*	n.a.
	BTZ	**25 µM**	**24 h**	540,2 ± 136,6, n=9	149,6 ± 145,7	-159,3 to 458,4	0,32	*n.s.*	0,06178
		25 µM	**48 h**	289,3 ± 198,9, n=9	-101,3 ± 205,3	-536,6 to 333,9	0,6283	*n.s.*	0,015
		50 µM	**24 h**	**0 ± 0, n=9**	**-390,7 ± 50,72**	**-498,2 to -283,1**	**<0,0001**	********	**0,7876**
	BSc5376	**25 µM**	**24 h**	295,3 ± 28,53, n=6	-95,33 ± 66,93	-239,9 to 49,27	0,1779	*n.s.*	0,135
		50 µM	**24 h**	**799 ± 91,81, n=6**	**408,3 ± 96,75**	**199,3 to 617,4**	**0,001**	******	**0,5781**
		25 µM	**48 h**	403,6 ± 30,92, n=9	12,89 ± 59,4	-113 to 138,8	0,831	*n.s.*	0,002934
Gesamtzahl der Bewegungen	**Kontrolle**				n.a.	n.a.	n.a.	*n.a.*	n.a.
	BTZ	**25 µM**	**24 h**	11,56 ± 3,33, n=9	-2,556 ± 4,37	-11,82 to 6,709	0,5669	*n.s.*	0,02092
		25 µM	**48 h**	**3,222 ± 2,259, n=9**	**-10,89 ± 3,622**	**-18,57 to -3,211**	**0,0084**	******	**0,361**
		50 µM	**24 h**	**0 ± 0, n=9**	**-14,11 ± 2,831**	**-20,11 to -8,11**	**0,0001**	*******	**0,6083**
	BSc5376	**25 µM**	**24 h**	11,5 ± 0,9916, n=6	-2,611 ± 3,6	-10,39 to 5,165	0,4811	*n.s.*	0,0389
		50 µM	**24 h**	**30,67 ± 3,252, n=6**	**16,56 ± 4,371**	**7,112 to 26**	**0,0023**	******	**0,5246**
		25 µM	**48 h**	16 ± 1,384, n=9	1,889 ± 3,151	-4,791 to 8,569	0,5573	*n.s.*	0,02197
Bewegungen pro 100 ms	**Kontrolle**			3,475 ± 0,3192, n=9	n.a.	n.a.	n.a.	*n.a.*	n.a.
	BTZ	**25 µM**	**24 h**	**1,916 ± 0,3504, n=9**	**-1,559 ± 0,4739**	**-2,563 to -0,554**	**0,0046**	******	**0,4034**
		25 µM	**48 h**	**0,2435 ± 0,1615, n=9**	**-3,231 ± 0,3577**	**-3,989 to -2,473**	**<0,0001**	********	**0,8361**
		50 µM	**24 h**	**0 ± 0, n=9**	**-3,475 ± 0,3192**	**-4,151 to -2,798**	**<0,0001**	********	**0,8811**
	BSc5376	**25 µM**	**24 h**	3,951 ± 0,246, n=6	0,4767 ± 0,4422	-0,4786 to 1,432	0,3006	*n.s.*	0,08205
		50 µM	**24 h**	3,877 ± 0,2249, n=6	0,4019 ± 0,4349	-0,5376 to 1,341	0,3722	*n.s.*	0,06165
		25 µM	**48 h**	4,02 ± 0,2617, n=9	0,545 ± 0,4127	-0,3299 to 1,42	0,2052	*n.s.*	0,09828

5.3.7.4 Darstellungen der Bewegungsamplitude der Embryonen

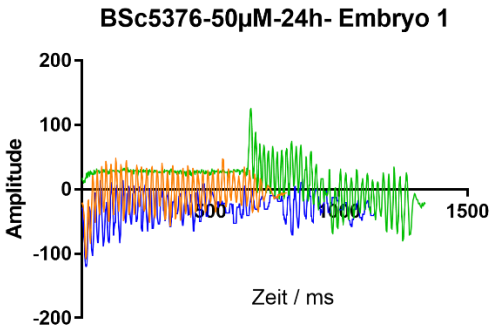
5.3.7.4.1 Kontrollgruppe

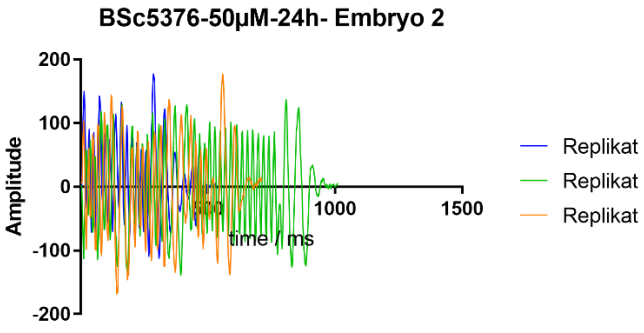




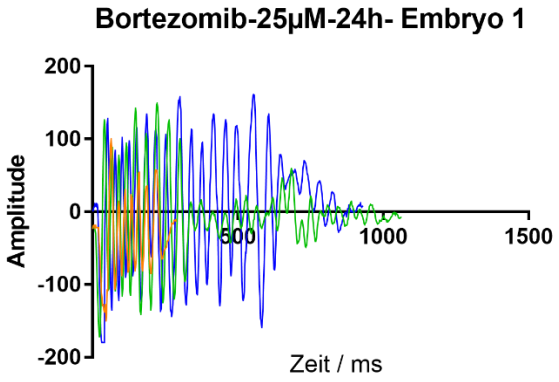


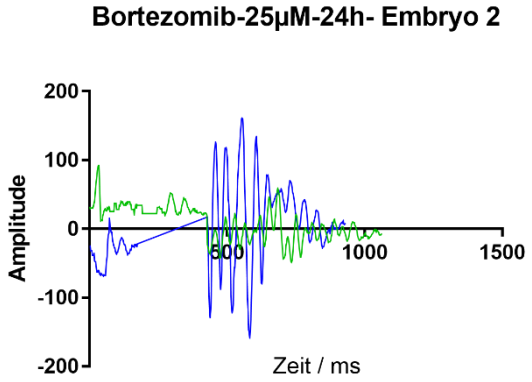
5.3.7.4.2 Behandlung mit BSc5376 (50 µM, 24 h)

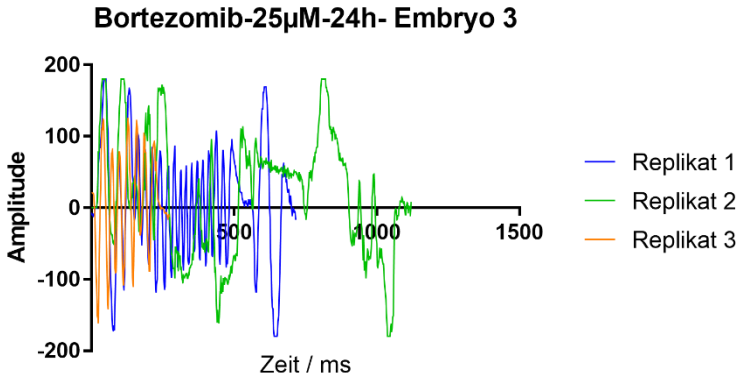




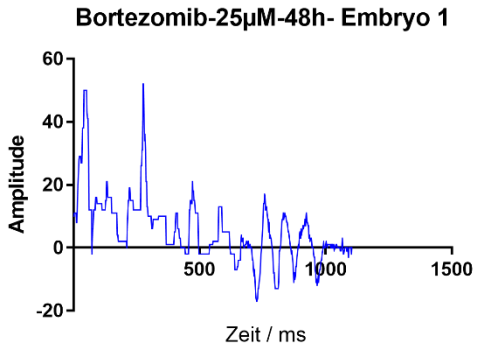
5.3.7.4.3 Behandlung mit Bortezomib (25 µM, 24 h)

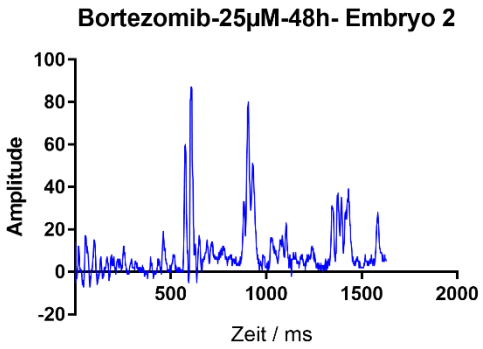


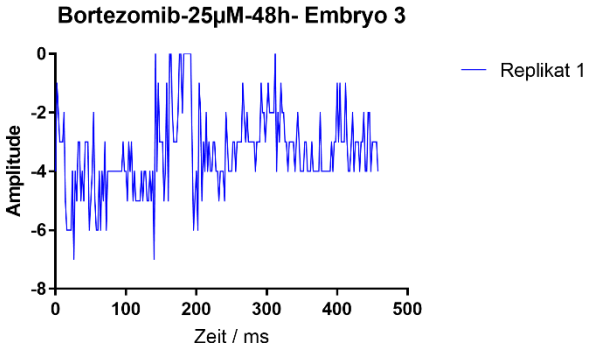




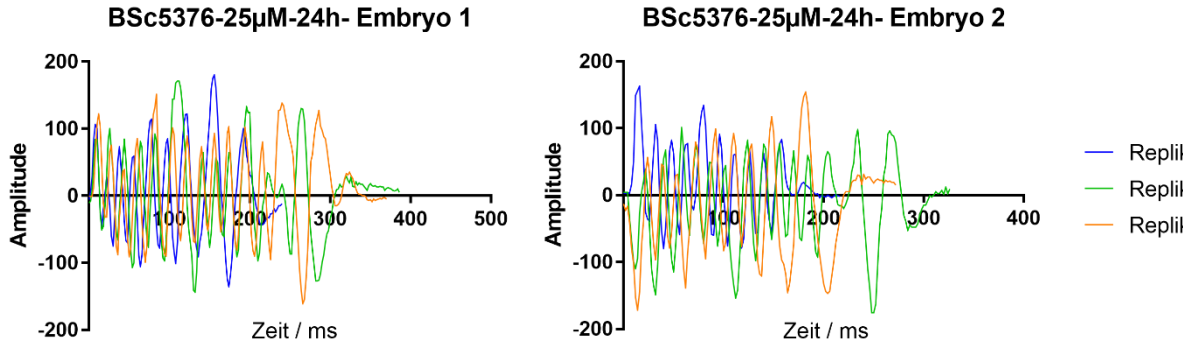
5.3.7.4.4 Behandlung mit Bortezomib (25 µM, 48 h)



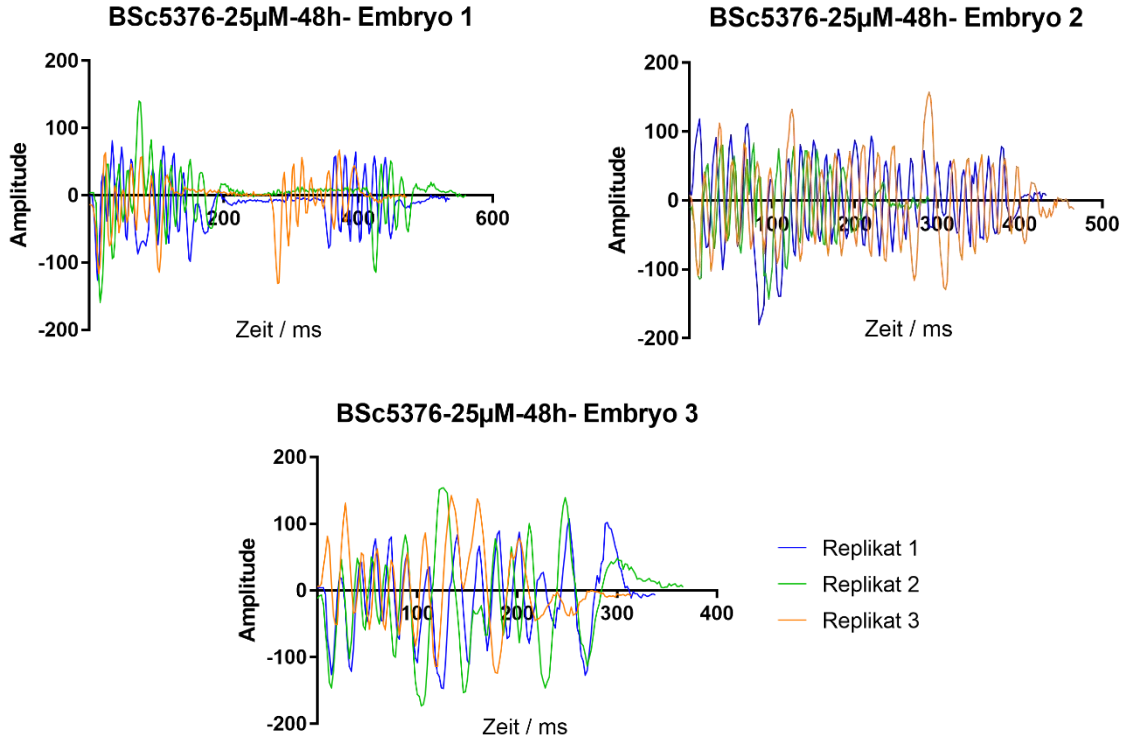




5.3.7.4.5 Behandlung mit BSc5376 (25 µM, 24 h)



5.3.7.4.6 Behandlung mit Bortezomib (25 µM, 48 h)



5.3.7.5 Vergleich der kinematischen Parameter zwischen der Kontrolle und mit Wirkstoff behandelten Embryonen

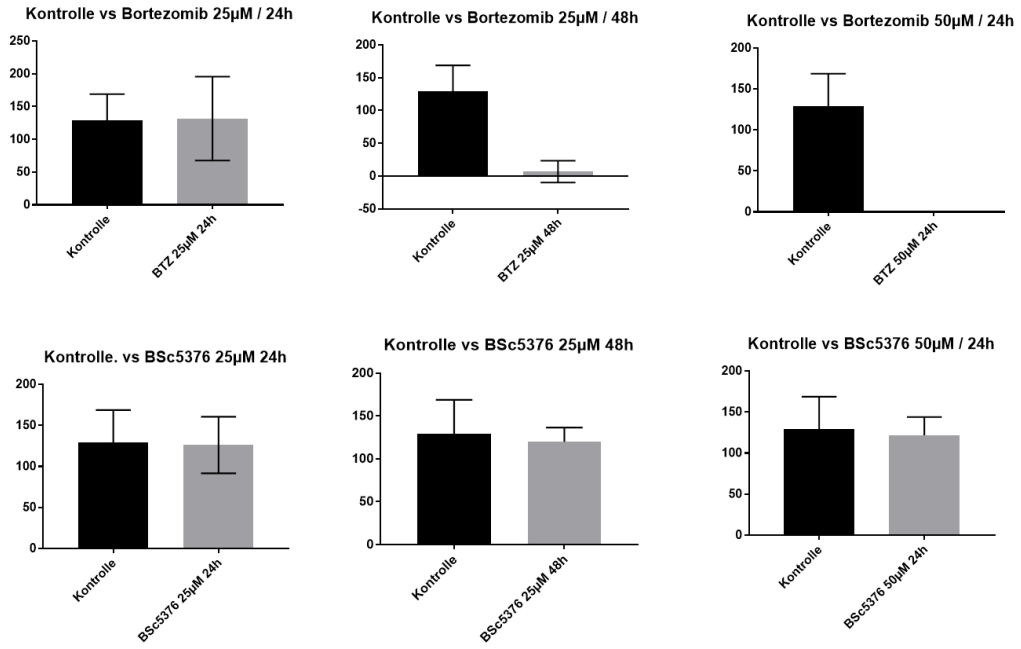


Abbildung 134. Vergleich der *C-Bend* Amplitude (°) der Kontrolle und der behandelten Embryonen.

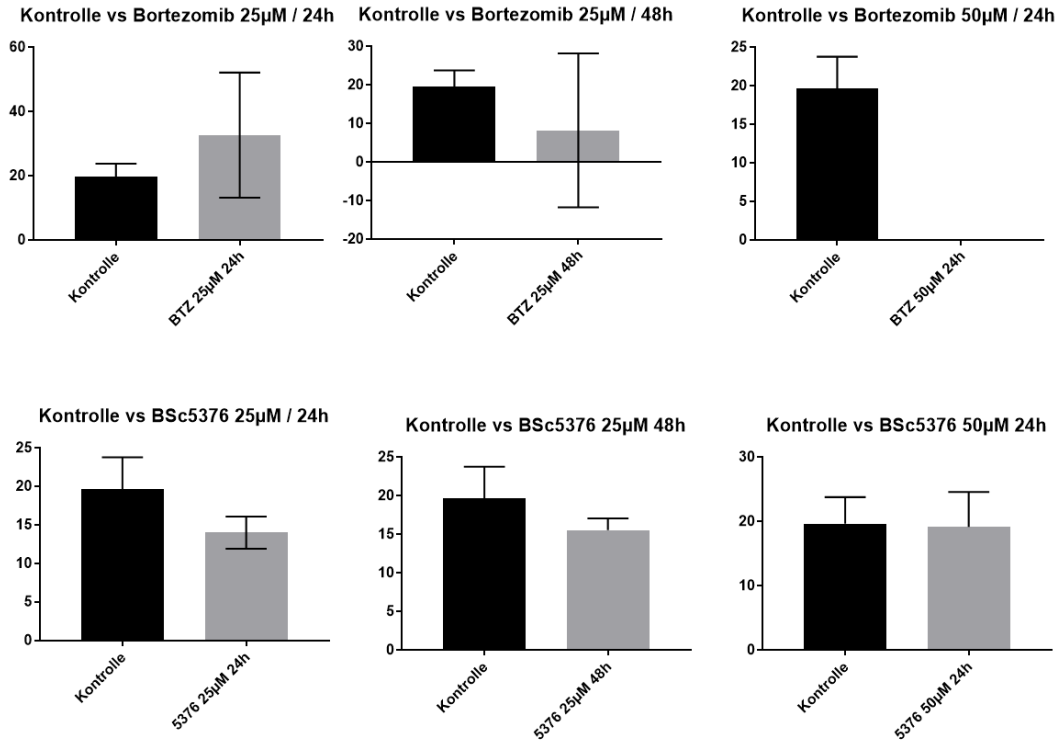


Abbildung 135. Vergleich der Dauer der *C-Bend* (ms) der Kontrolle und der behandelten Embryonen.

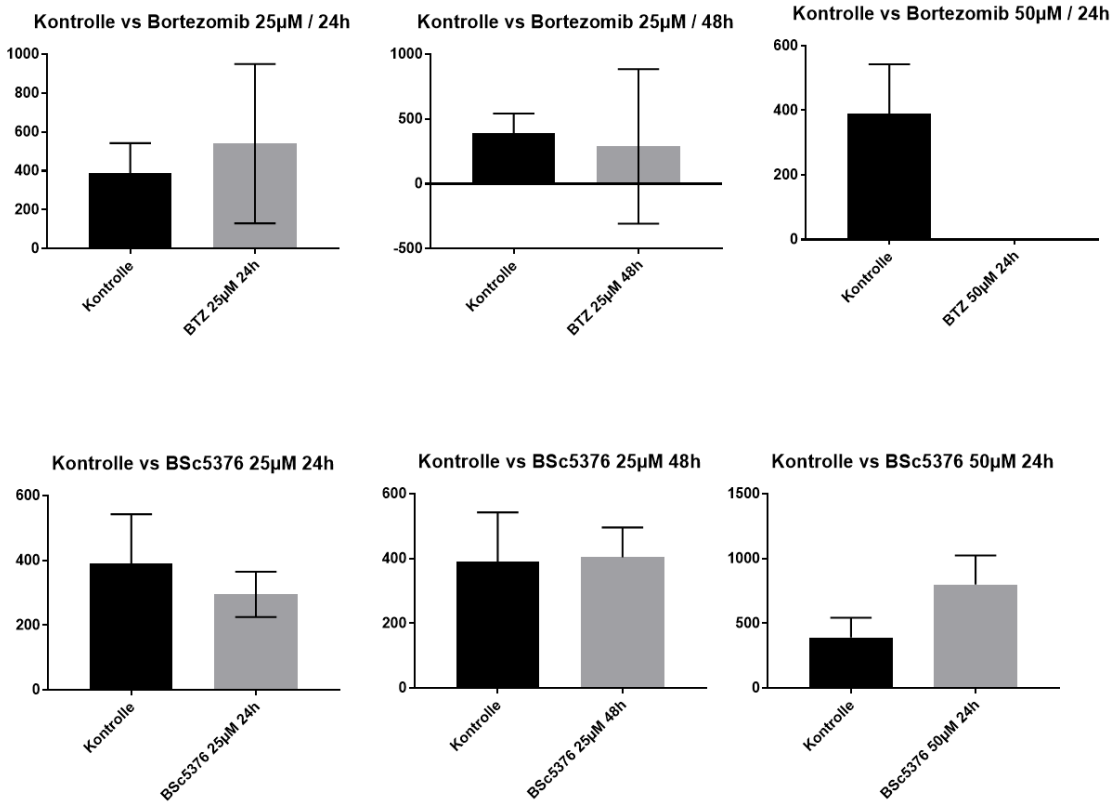


Abbildung 136. Vergleich der Dauer (ms) des Fluchtreflexes der Kontrolle und der behandelten Embryonen.

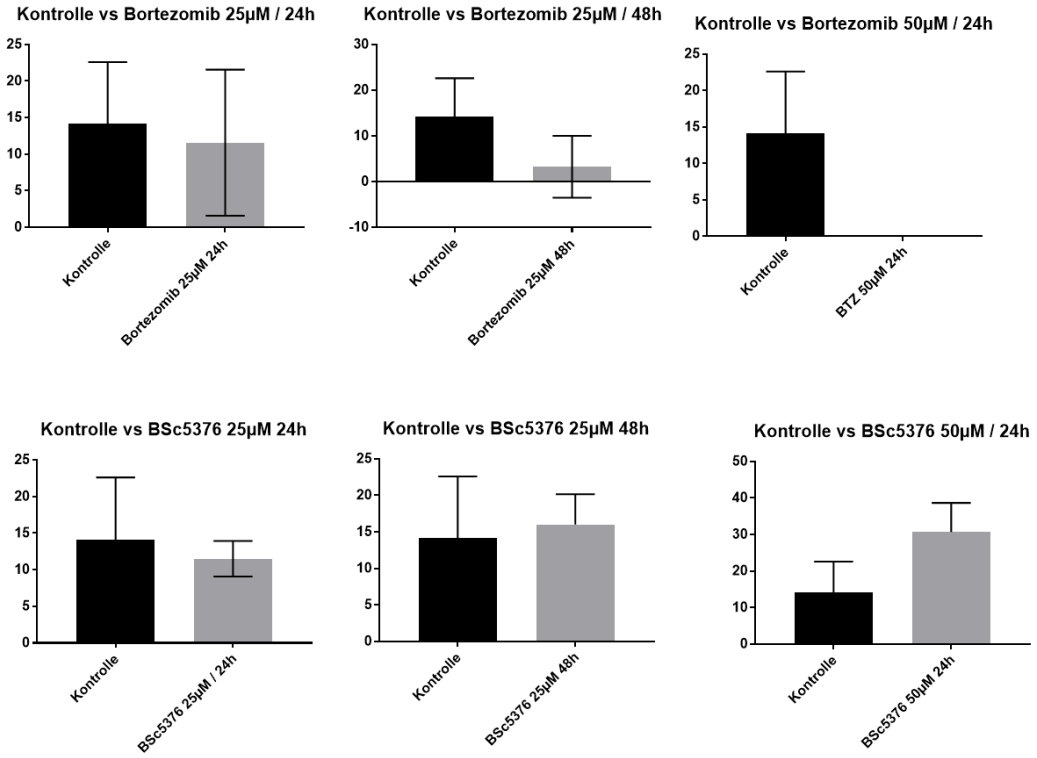


Abbildung 137. Vergleich der Anzahl der Bewegungen während des Fluchtreflexes der Kontrolle und der behandelten Embryonen.

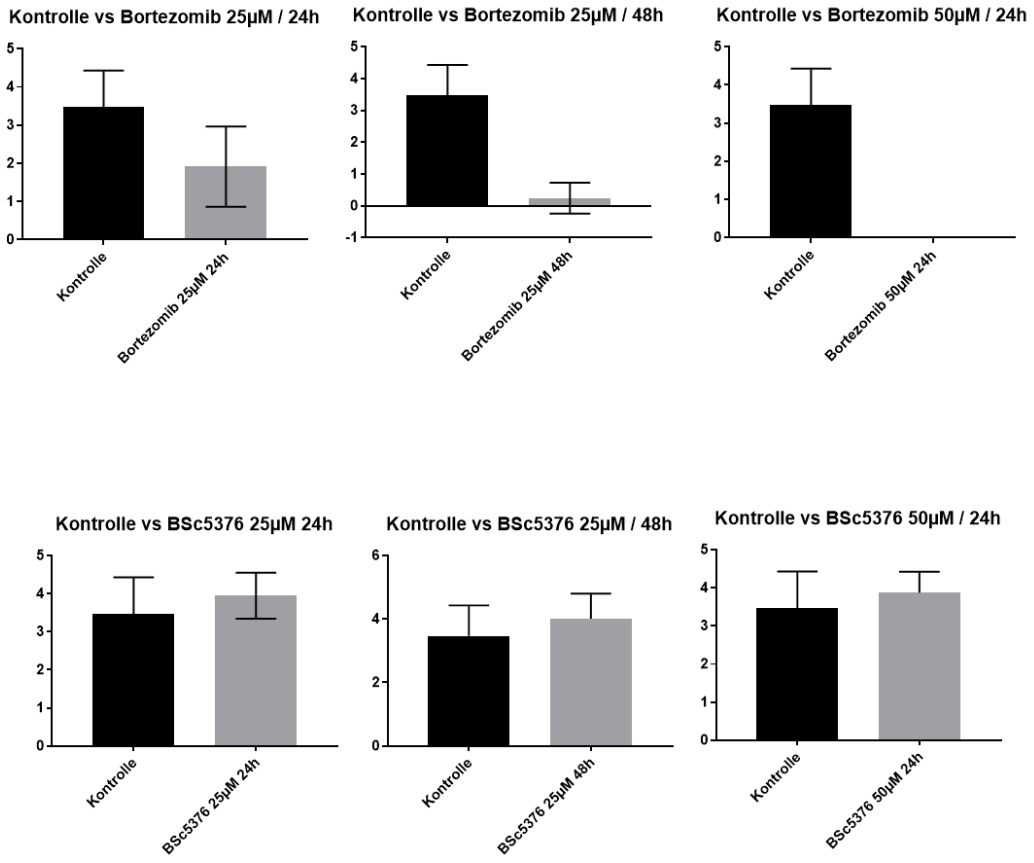


Abbildung 138. Vergleich der Anzahl der Bewegungen pro 100 ms während des Fluchtreflexes der Kontrolle und der behandelten Embryonen.

1. Kampen, K. R., The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research* **2012,** *36* (1), 6-13.

2. Arber, D. A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; Thiele, J.; Borowitz, M. J.; Le Beau, M. M.; Bloomfield, C. D.; Cazzola, M.; Vardiman, J. W., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016,** *127* (20), 2391-2405.

3. Carroll, M. C., The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology* **2004,** *5*, 981.

4. Malvezzi, M.; Carioli, G.; Bertuccio, P.; Rosso, T.; Boffetta, P.; Levi, F.; La Vecchia, C.; Negri, E., European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Annals of Oncology* **2016,** *27* (4), 725-731.

5. Nabhan, C.; Rosen, S. T., Chronic lymphocytic leukemia: A clinical review. *JAMA* **2014,** *312* (21), 2265-2276.

6. Laurenti, E.; Göttgens, B., From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* **2018,** *553*, 418.

7. Dearden, C., Hairy cell leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2015,** *28* (4), 163-165.

8. Utsunomiya, A.; Choi, I.; Chihara, D.; Seto, M., Recent advances in the treatment of adult T-cell leukemia-lymphomas. *Cancer Science* **2015,** *106* (4), 344-351.

9. Makishima, H.; Yoshizato, T.; Yoshida, K.; Sekeres, M. A.; Radivoyevitch, T.; Suzuki, H.; Przychodzen, B.; Nagata, Y.; Meggendorfer, M.; Sanada, M.; Okuno, Y.; Hirsch, C.; Kuzmanovic, T.; Sato, Y.; Sato-Otsubo, A.; LaFramboise, T.; Hosono, N.; Shiraishi, Y.; Chiba, K.; Haferlach, C.; Kern, W.; Tanaka, H.; Shiozawa, Y.; Gómez-Seguí, I.; Husseinzadeh, H. D.; Thota, S.; Guinta, K. M.; Dienes, B.; Nakamaki, T.; Miyawaki, S.; Saunthararajah, Y.; Chiba, S.; Miyano, S.; Shih, L.-Y.; Haferlach, T.; Ogawa, S.; Maciejewski, J. P., Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics* **2016,** *49*, 204.

10. Cheson, B. D.; Fisher, R. I.; Barrington, S. F.; Cavalli, F.; Schwartz, L. H.; Zucca, E.; Lister, T. A.; Alliance, A. L.; Lymphoma, G.; Eastern Cooperative Oncology, G.; European Mantle Cell Lymphoma, C.; Italian Lymphoma, F.; European Organisation for, R.; Treatment of Cancer/Dutch Hemato-Oncology, G.; Grupo Español de Médula, Ó.; German High-Grade Lymphoma Study, G.; German Hodgkin's Study, G.; Japanese Lymphorra Study, G.; Lymphoma Study, A.; Group, N. C. T.; Nordic Lymphoma Study, G.; Southwest Oncology, G.; United Kingdom National Cancer Research, I., Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano

classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2014,** *32* (27), 3059-3068.

11. Albrecht, T. A., Physiologic and psychological symptoms experienced by adults with acute leukemia: an integrative literature review. *Oncology nursing forum* **2014,** *41* (3), 286-295.

12. Clarke, R. T.; Van den Bruel, A.; Bankhead, C.; Mitchell, C. D.; Phillips, B.; Thompson, M. J., Clinical presentation of childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood* **2016,** *101* (10), 894-901.

13. Shephard, E. A.; Neal, R. D.; Rose, P. W.; Walter, F. M.; Hamilton, W., Symptoms of adult chronic and acute leukaemia before diagnosis: large primary care case-control studies using electronic records. *British Journal of General Practice* **2016,** *66* (644), e182-e188.

14. Robinson, C.; Jackson, R.; Sauaia, A.; Cohen, M., 2006. Implementation of the T2 Biosystems T2Bacteria Panel in a Level-One Trauma Center, Safety Net Hospital. *Open Forum Infectious Diseases* **2018,** *5* (suppl_1), S584-S584.

15. Mitchell, C.; Hall, G.; Clarke, R. T., Acute leukaemia in children: diagnosis and management. *BMJ* **2009,** *338*.

16. Chang, H. Y.; Rodriguez, V.; Narboni, G.; Bodey, G. P.; Luna, M. A.; Freireich, E. J., Causes of death in adults with acute leukemia. *Medicine* **1976,** *55* (3), 259-68.

17. Austin, H.; Delzell, E.; Cole, P., Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Am J Epidemiol* **1988,** *127* (3), 419-439.

18. Boffetta, P.; Stellman, S. D.; Garfinkel, L., Diesel exhaust exposure and mortality among males in the American cancer society prospective study. *American Journal of Industrial Medicine* **1988,** *14* (4), 403-415.

19. Radivoyevitch, T.; Sachs, R. K.; Gale, R. P.; Molenaar, R. J.; Brenner, D. J.; Hill, B. T.; Kalaycio, M. E.; Carraway, H. E.; Mukherjee, S.; Sekeres, M. A.; Maciejewski, J. P., Defining AML and MDS second cancer risk dynamics after diagnoses of first cancers treated or not with radiation. *Leukemia* **2015,** *30*, 285.

20. Kossman, S. E.; Weiss, M. A., Acute myelogenous leukemia after exposure to strontium-89 for the treatment of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* **2000,** *88* (3), 620-4.

21. Schmitz-Feuerhake, I.; Dannheim, B.; Heimers, A.; Oberheitmann, B.; Schröder, H.; Ziggel, H., Leukemia in the proximity of a German boiling-water nuclear reactor: evidence of population exposure by chromosome studies and environmental radioactivity. *Environmental Health Perspectives* **1997,** *105* (suppl 6), 1499-1504.

22. Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Gazdar, A. F.; Bunn, P. A.; Minna, J. D.; Gallo, R. C., Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a

patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980,** *77* (12), 7415-7419.
23. Rudant, J.; Amigou, A.; Orsi, L.; Althaus, T.; Leverger, G.; Baruchel, A.; Bertrand, Y.; Nelken, B.; Plat, G.; Michel, G.; Sirvent, N.; Chastagner, P.; Ducassou, S.; Rialland, X.; Hémon, D.; Clavel, J., Fertility treatments, congenital malformations, fetal loss, and childhood acute leukemia: The ESCALE study (SFCE). *Pediatric Blood & Cancer* **2013,** *60* (2), 301-308.
24. Creutzig, U.; Ritter, J.; Vormoor, J.; Ludwig, W. D.; Niemeyer, C.; Reinisch, I.; Stollmann-Gibbels, B.; Zimmermann, M.; Harbott, J., Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML-BFM Study Group. *Leukemia* **1996,** *10* (11), 1677-1686.
25. Malone, F. D.; Canick, J. A.; Ball, R. H.; Nyberg, D. A.; Comstock, C. H.; Bukowski, R.; Berkowitz, R. L.; Gross, S. J.; Dugoff, L.; Craigo, S. D.; Timor-Tritsch, I. E.; Carr, S. R.; Wolfe, H. M.; Dukes, K.; Bianchi, D. W.; Rudnicka, A. R.; Hackshaw, A. K.; Lambert-Messerlian, G.; Wald, N. J.; D'Alton, M. E., First-Trimester or Second-Trimester Screening, or Both, for Down's Syndrome. *New England Journal of Medicine* **2005,** *353* (19), 2001-2011.
26. Bhatnagar, N.; Nizery, L.; Tunstall, O.; Vyas, P.; Roberts, I., Transient Abnormal Myelopoiesis and AML in Down Syndrome: an Update. *Current hematologic malignancy reports* **2016,** *11* (5), 333-341.
27. Klein, A. d.; Kessel, A. G. v.; Grosveld, G.; Bartram, C. R.; Hagemeijer, A.; Bootsma, D.; Spurr, N. K.; Heisterkamp, N.; Groffen, J.; Stephenson, J. R., A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **1982,** *300*, 765.
28. Druker, B. J.; Lydon, N. B., Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* **2000,** *105* (1), 3-7.
29. Wiemels, J., Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-biological interactions* **2012,** *196* (3), 59-67.
30. Cassileth, P. A.; Sylvester, L. S.; Bennett, J. M.; Begg, C. B., High peripheral blast count in adult acute myelogenous leukemia is a primary risk factor for CNS leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **1988,** *6* (3), 495-498.
31. Döhner, H.; Estey, E. H.; Amadori, S.; Appelbaum, F. R.; Büchner, T.; Burnett, A. K.; Dombret, H.; Fenaux, P.; Grimwade, D.; Larson, R. A.; Lo-Coco, F.; Naoe, T.; Niederwieser, D.; Ossenkoppele, G. J.; Sanz, M. A.; Sierra, J.; Tallman, M. S.; Löwenberg, B.; Bloomfield, C. D., Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **2010,** *115* (3), 453-474.

32. de Jonge, H. J. M.; Valk, P. J. M.; de Bont, E. S. J. M.; Schuringa, J. J.; Ossenkoppele, G.; Vellenga, E.; Huls, G., Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. *Haematologica* **2011,** *96* (9), 1310-1317.

33. Aitelli, C.; Wasson, L.; Page, R., Pernicious anemia: presentations mimicking acute leukemia. *Southern medical journal* **2004,** *97* (3), 295-7.

34. Dokal, I. S.; Cox, T. M.; Galton, D. A., Vitamin B-12 and folate deficiency presenting as leukaemia. *BMJ (Clinical research ed.)* **1990,** *300* (6734), 1263-1264.

35. Bennett, J. M.; Catovsky, D.; Daniel, M.-T.; Flandrin, G.; Galton, D. A. G.; Gralnick, H. R.; Sultan, C., Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology* **1976,** *33* (4), 451-458.

36. Vardiman, J. W.; Thiele, J.; Arber, D. A.; Brunning, R. D.; Borowitz, M. J.; Porwit, A.; Harris, N. L.; Le Beau, M. M.; Hellström-Lindberg, E.; Tefferi, A.; Bloomfield, C. D., The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **2009,** *114* (5), 937-951.

37. Renneville, A.; Roumier, C.; Biggio, V.; Nibourel, O.; Boissel, N.; Fenaux, P.; Preudhomme, C., Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* **2008,** *22*, 915.

38. Nguyen, S.; Leblanc, T.; Fenaux, P.; Witz, F.; Blaise, D.; Pigneux, A.; Thomas, X.; Rigal-Huguet, F.; Lioure, B.; Auvrignon, A.; Fière, D.; Reiffers, J.; Castaigne, S.; Leverger, G.; Harousseau, J.-L.; Socié, G.; Dombret, H., A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* **2002,** *99* (10), 3517-3523.

39. Disease, G. B. D.; Injury, I.; Prevalence, C., Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)* **2016,** *388* (10053), 1545-1602.

40. Young, J. L.; Ries, L. G.; Silverberg, E.; Horm, J. W.; Miller, R. W., Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer* **1986,** *58* (S2), 598-602.

41. Nennecke, A.; Wienecke, A.; Kraywinkel, K., Inzidenz und Überleben bei Leukämien in Deutschland nach aktuellen standardisierten Kategorien. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **2014,** *57* (1), 93-102.

42. Pulte, D.; Redaniel, M. T.; Jansen, L.; Brenner, H.; Jeffreys, M., Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: overall improvements, but persistent and

partly increasing disparity in survival of patients from minority groups. *Haematologica* **2013,** *98* (2), 222-229.

43. Pulte, D.; Gondos, A.; Brenner, H., Expected long-term survival of patients diagnosed with acute myeloblastic leukemia during 2006–2010. *Annals of Oncology* **2010,** *21* (2), 335-341.

44. Pulte, D.; Redaniel, M. T.; Brenner, H.; Jeffreys, M., Changes in survival by ethnicity of patients with cancer between 1992–1996 and 2002–2006: is the discrepancy decreasing? *Annals of Oncology* **2012,** *23* (9), 2428-2434.

45. Bonaventure, A.; Harewood, R.; Stiller, C. A.; Gatta, G.; Clavel, J.; Stefan, D. C.; Carreira, H.; Spika, D.; Marcos-Gragera, R.; Peris-Bonet, R.; Piñeros, M.; Sant, M.; Kuehni, C. E.; Murphy, M. F. G.; Coleman, M. P.; Allemani, C.; Bouzbid, S.; Hamdi-Chérif, M.; Zaidi, Z.; Bah, E.; Swaminathan, R.; Nortje, S. H.; El Mistiri, M. M.; Bayo, S.; Malle, B.; Manraj, S. S.; Sewpaul-Sungkur, R.; Fabowale; Ogunbiyi, O. J.; Bradshaw, D.; Somdyala, N. I. M.; Stefan, D. C.; Abdel-Rahman, M.; Jaidane, L.; Mokni, M.; Kumcher, I.; Moreno, F.; González, M. S.; Laura, E. A.; Espinola, S. B.; Calabrano, G. H.; Carballo Quintero, B.; Fita, R.; Garcilazo, D. A.; Giacciani, P. L.; Diumenjo, M. C.; Laspada, W. D.; Green, M. A.; Lanza, M. F.; Ibañez, S. G.; Lima, C. A.; de Oliveira, E. L.; Daniel, C.; Scandiuzzi, C.; De Souza, P. C. F.; Melo, C. D.; Del Pino, K.; Laporte, C.; Curado, M. P.; de Oliveira, J. C.; Veneziano, C. L. A.; Veneziano, D. B.; Azevedo e Silva, G.; Galaz, J. C.; Moya, J. A.; Herrmann, D. A.; Vargas, S.; Herrera, V. M.; Uribe, C. J.; Bravo, L. E.; Arias-Ortiz, N. E.; Jurado, D. M.; Yépez, M. C.; Galán, Y. H.; Torres, P.; Martínez-Reyes, F.; Pérez-Meza, M. L.; Jaramillo, L.; Quinto, R.; Cueva, P.; Yépez, J. G.; Torres-Cintrón, C. R.; Tortolero-Luna, G.; Alonso, R.; Barrios, E.; Nikiforuk, C.; Shack, L.; Coldman, A. J.; Woods, R. R.; Noonan, G.; Turner, D.; Kumar, E.; Zhang, B.; McCrate, F. R.; Ryan, S.; Hannah, H.; Dewar, R. A. D.; MacIntyre, M.; Lalany, A.; Ruta, M.; Marrett, L.; Nishri, D. E.; McClure, C.; Vriends, K. A.; Bertrand, C.; Louchini, R.; Robb, K. I.; Stuart-Panko, H.; Demers, S.; Wright, S.; George, J. T.; Shen, X.; Brockhouse, J. T.; O'Brien, D. K.; Ward, K. C.; Almon, L.; Bates, J.; Rycroft, R.; Mueller, L.; Phillips, C.; Brown, H.; Cromartie, B.; Schwartz, A. G.; Vigneau, F.; MacKinnon, J. A.; Wohler, B.; Bayakly, A. R.; Clarke, C. A.; Glaser, S. L.; West, D.; Green, M. D.; Hernandez, B. Y.; Johnson, C. J.; Jozwik, D.; Charlton, M. E.; Lynch, C. F.; Huang, B.; Tucker, T. C.; Deapen, D.; Liu, L.; Hsieh, M. C.; Wu, X. C.; Stern, K.; Gershman, S. T.; Knowlton, R. C.; Alverson, J.; Copeland, G. E.; Rogers, D. B.; Lemons, D.; Williamson, L. L.; Hood, M.; Hosain, G. M.; Rees, J. R.; Pawlish, K. S.; Stroup, A.; Key, C.; Wiggins, C.; Kahn, A. R.; Schymura, M. J.; Leung, G.; Rao, C.; Giljahn, L.; Warther, B.; Pate, A.; Patil, M.; Schubert, S. S.; Rubertone, J. J.; Slack, S. J.; Fulton, J. P.; Rousseau, D. L.; Janes, T. A.; Schwartz, S. M.; Bolick, S. W.; Hurley, D. M.; Richards, J.; Whiteside, M. A.; Nogueira, L. M.; Herget, K.; Sweeney, C.; Martin, J.; Wang, S.; Harrelson, D. G.; Cheteri, M.

B. K.; Farley, S.; Hudson, A. G.; Borchers, R.; Stephenson, L.; Espinoza, J. R.; Weir, H. K.; Edwards, B. K.; Wang, N.; Yang, L.; Chen, J. S.; Song, G. H.; Gu, X. P.; Zhang, P.; Ge, H. M.; Zhao, D. L.; Zhang, J. H.; Zhu, F. D.; Tang, J. G.; Shen, Y.; Wang, J.; Li, Q. L.; Yang, X. P.; Dong, J.; Li, W.; Cheng, L. P.; Chen, J. G.; Huang, Q. H.; Huang, S. Q.; Guo, G. P.; Wei, K.; Chen, W. Q.; Zeng, H.; Demetriou, A. V.; Pavlou, P.; Mang, W. K.; Ngan, K. C.; Swaminathan, R.; Kataki, A. C.; Krishnatreya, M.; Jayalekshmi, P. A.; Sebastian, P.; Sapkota, S. D.; Verma, Y.; Nandakumar, A.; Suzanna, E.; Keinan-Boker, L.; Silverman, B. G.; Ito, H.; Nakagawa, H.; Hattori, M.; Kaizaki, Y.; Sugiyama, H.; Utada, M.; Katayama, K.; Narimatsu, H.; Kanemura, S.; Koike, T.; Miyashiro, I.; Yoshii, M.; Oki, I.; Shibata, A.; Matsuda, T.; Nimri, O.; Ab Manan, A.; Pathy, N. B.; Chimedsuren, O.; Tuvshingerel, S.; Al Khater, A. H. M.; El Mistiri, M. M.; Al-Eid, H.; Jung, K. W.; Won, Y. J.; Chiang, C. J.; Lai, M. S.; Suwanrungruang, K.; Wiangnon, S.; Daoprasert, K.; Pongnikorn, D.; Geater, S. L.; Sriplung, H.; Eser, S.; Yakut, C. I.; Hackl, M.; Mühlböck, H.; Oberaigner, W.; Zborovskaya, A. A.; Aleinikova, O. V.; Henau, K.; Van Eycken, L.; Dimitrova, N.; Valerianova, Z.; Šekerija, M.; Zvolský, M.; Engholm, G.; Storm, H.; Innos, K.; Mägi, M.; Malila, N.; Seppä, K.; Jégu, J.; Velten, M.; Cornet, E.; Troussard, X.; Bouvier, A. M.; Faivre, J.; Guizard, A. V.; Bouvier, V.; Launoy, G.; Arveux, P.; Maynadié, M.; Mounier, M.; Fournier, E.; Woronoff, A. S.; Daoulas, M.; Clavel, J.; Le Guyader-Peyrou, S.; Monnereau, A.; Trétarre, B.; Colonna, M.; Cowppli-Bony, A.; Molinié, F.; Bara, S.; Degré, D.; Ganry, O.; Lapôtre-Ledoux, B.; Grosclaude, P.; Estève, J.; Bray, F.; Piñeros, M.; Sassi, F.; Stabenow, R.; Eberle, A.; Erb, C.; Nennecke, A.; Kieschke, J.; Sirri, E.; Kajueter, H.; Emrich, K.; Zeissig, S. R.; Holleczek, B.; Eisemann, N.; Katalinic, A.; Brenner, H.; Asquez, R. A.; Kumar, V.; Ólafsdóttir, E. J.; Tryggvadóttir, L.; Comber, H.; Walsh, P. M.; Sundseth, H.; Devigili, E.; Mazzoleni, G.; Giacomin, A.; Bella, F.; Castaing, M.; Sutera, A.; Gola, G.; Ferretti, S.; Serraino, D.; Zucchetto, A.; Lillini, R.; Vercelli, M.; Busco, S.; Pannozzo, F.; Vitarelli, S.; Ricci, P.; Pascucci, C.; Autelitano, M.; Cirilli, C.; Federico, M.; Fusco, M.; Vitale, M. F.; Usala, M.; Cusimano, R.; Mazzucco, W.; Michiara, M.; Sgargi, P.; Maule, M. M.; Sacerdote, C.; Tumino, R.; Di Felice, E.; Vicentini, M.; Falcini, F.; Cremone, L.; Budroni, M.; Cesaraccio, R.; Contrino, M. L.; Tisano, F.; Fanetti, A. C.; Maspero, S.; Candela, G.; Scuderi, T.; Gentilini, M. A.; Piffer, S.; Rosso, S.; Sacchetto, L.; Caldarella, A.; La Rosa, F.; Stracci, F.; Contiero, P.; Tagliabue, G.; Dei Tos, A. P.; Zorzi, M.; Zanetti, R.; Baili, P.; Berrino, F.; Gatta, G.; Sant, M.; Capocaccia, R.; De Angelis, R.; Liepina, E.; Maurina, A.; Smailyte, G.; Agius, D.; Calleja, N.; Siesling, S.; Visser, O.; Larønningen, S.; Møller, B.; Dyzmann-Sroka, A.; Trojanowski, M.; Gózdz, S.; Mezyk, R.; Gradalska-Lampart, M.; Radziszewska, A. U.; Didkowska, J. A.; Wojciechowska, U.; Blaszczyk, J.; Kepska, K.; Bielska-Lasota, M.; Kwiatkowska, K.; Forjaz, G.; Rego, R. A.; Bastos, J.; Silva, M. A.; Antunes, L.; Bento, M. J.; Mayer-da-Silva, A.; Miranda, A.; Coza, D.; Todescu, A. I.; Valkov, M. Y.; Adamcik, J.; Safaei Diba, C.; Primic-Žakelj, M.; Žagar, T.; Stare, J.; Almar, E.;

Mateos, A.; Quirós, J. R.; Bidaurrazaga, J.; Larrañaga, N.; Díaz García, J. M.; Marcos, A. I.; Marcos-Gragera, R.; Vilardell Gil, M. L.; Molina, E.; Sánchez, M. J.; Sureda, P. F.; Montserrat, M. R.; Chirlaque, M. D.; Navarro, C.; Ardanaz, E. E.; Moreno-Iribas, C. C.; Fernández-Delgado, R.; Peris-Bonet, R.; Galceran, J.; Khan, S.; Lambe, M.; Camey, B.; Bouchardy, C.; Usel, M.; Ess, S. M.; Herrmann, C.; Bulliard, J. L.; Maspoli-Conconi, M.; Frick, H.; Kuehni, C. E.; Schindler, M.; Bordoni, A.; Spitale, A.; Chiolero, A.; Konzelmann, I.; Dehler, S. I.; Matthes, K. L.; Rashbass, J.; Stiller, C. A.; Fitzpatrick, D.; Gavin, A.; Bannon, F.; Black, R. J.; Brewster, D. H.; Huws, D. W.; White, C.; Finan, P.; Allemani, C.; Bonaventure, A.; Carreira, H.; Coleman, M. P.; Di Carlo, V.; Harewood, R.; Liu, K.; Matz, M.; Montel, L.; Nikšić, M.; Rachet, B.; Sanz, N.; Spika, D.; Stephens, R.; Peake, M.; Murphy, M. F. G.; Chalker, E.; Newman, L.; Baker, D.; Soeberg, M. J.; Aitken, J.; Scott, C.; Stokes, B. C.; Venn, A.; Farrugia, H.; Giles, G. G.; Threlfall, T.; Currow, D.; You, H.; Hendrix, J.; Lewis, C.; Latorre, M.; Tanaka, L. F., Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995–2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *The Lancet Haematology* **2017,** *4* (5), e202-e217.

46. Walker, G. V.; Shihadeh, F.; Kantarjian, H.; Allen, P.; Rondon, G.; Kebriaei, P.; O'Brien, S.; Kedir, A.; Said, M.; Grant, J. D.; Thomas, D. A.; Gidley, P. W.; Arzu, I.; Pinnix, C.; Reed, V.; Dabaja, B. S., Comprehensive craniospinal radiation for controlling central nervous system leukemia. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **2014,** *90* (5), 1119-25.

47. Dombret, H.; Gardin, C., An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* **2016,** *127* (1), 53-61.

48. Nowak, D.; Stewart, D.; Koeffler, H. P., Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* **2009,** *113* (16), 3655-3665.

49. Lin, R. J.; Nagy, L.; Inoue, S.; Shao, W.; Miller, W. H., Jr.; Evans, R. M., Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* **1998,** *391* (6669), 811-4.

50. Sakura, T.; Hayakawa, F.; Sugiura, I.; Murayama, T.; Imai, K.; Usui, N.; Fujisawa, S.; Yamauchi, T.; Yujiri, T.; Kakihana, K.; Ito, Y.; Kanamori, H.; Ueda, Y.; Miyata, Y.; Kurokawa, M.; Asou, N.; Ohnishi, K.; Ohtake, S.; Kobayashi, Y.; Matsuo, K.; Kiyoi, H.; Miyazaki, Y.; Naoe, T., High-dose methotrexate therapy significantly improved survival of adult acute lymphoblastic leukemia: a phase III study by JALSG. *Leukemia* **2018,** *32* (3), 626-632.

51. van Dongen, J. J.; Breit, T. M.; Adriaansen, H. J.; Beishuizen, A.; Hooijkaas, H., Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* **1992,** *6 Suppl 1*, 47-59.

52. van Dongen, J. J. M.; van der Velden, V. H. J.; Brüggemann, M.; Orfao, A., Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* **2015,** *125* (26), 3996-4009.
53. Bose, P.; Vachhani, P.; Cortes, J. E., Treatment of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Current treatment options in oncology* **2017,** *18* (3), 17.
54. Kassim, A. A.; Savani, B. N., Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematology/oncology and stem cell therapy* **2017,** *10* (4), 245-251.
55. Gladstone, D. E.; Bettinotti, M. P., HLA donor-specific antibodies in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: challenges and opportunities. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2017,** *2017* (1), 645-650.
56. Tan, J.; Wang, Y.; Yu, S. J.; Ma, Y. Y.; Lei, H. Y.; Liu, Q. F., Prognostic factors on graft-versus-host disease-free and relapse-free survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adults with acute leukemia. *Leuk Res* **2017,** *59*, 1-7.
57. Rizzieri, D. A.; Talbot, J. T.; Long, G. D.; Vredenburgh, J. J.; Gasparetto, C.; Smith, C. S.; Colvin, M. O.; Adams, D.; Morris, A.; Dodge, R.; Loftis, J.; Waters-Pick, B.; Reese, M.; Carawan, H.; Koh, L. P.; Chao, N. J., 4-Hydroperoxycyclophosphamide–purged peripheral blood stem cells for autologous transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **2003,** *9* (3), 183-188.
58. Feller, N.; van der Pol, M. A.; Waaijman, T.; Weijers, G. W. D.; Westra, G.; Ossenkoppele, G. J.; Schuurhuis, G. J., Immunologic Purging of Autologous Peripheral Blood Stem Cell Products Based on CD34 and CD133 Expression Can Be Effectively and Safely Applied in Half of the Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clinical Cancer Research* **2005,** *11* (13), 4793-4801.
59. Ossenkoppele, G. J.; Janssen, J. J.; Huijgens, P. C., Autologous Stem Cell Transplantation in elderly Acute Myeloid Leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* **2013,** *5* (1), e2013018-e2013018.
60. Erba, H. P., Finding the optimal combination therapy for the treatment of newly diagnosed AML in older patients unfit for intensive therapy. *Leukemia Research* **2015,** *39* (2), 183-191.
61. Raut, L. S., Novel formulation of cytarabine and daunorubicin: A new hope in AML treatment. *South Asian journal of cancer* **2015,** *4* (1), 38-40.
62. Perl, A. E., The role of targeted therapy in the management of patients with AML. *Blood Advances* **2017,** *1* (24), 2281-2294.
63. Staudt, D.; Murray, H.; McLachlan, T.; Alvaro, F.; Enjeti, A.; Verrills, N.; Dun, M., Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *International journal of molecular sciences* **2018,** *19* (10), 3198.

64. Bacher, U.; Haferlach, C.; Kern, W.; Haferlach, T.; Schnittger, S., Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood* **2008,** *111* (5), 2527-2537.
65. Levis, M., Midostaurin approved for FLT3-mutated AML. *Blood* **2017,** *129* (26), 3403-3406.
66. Stone, R. M.; Manley, P. W.; Larson, R. A.; Capdeville, R., Midostaurin: its odyssey from discovery to approval for treating acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis. *Blood Advances* **2018,** *2* (4), 444-453.
67. Griffith, J.; Black, J.; Faerman, C.; Swenson, L.; Wynn, M.; Lu, F.; Lippke, J.; Saxena, K., The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular cell* **2004,** *13* (2), 169-78.
68. Medeiros, B. C.; Fathi, A. T.; DiNardo, C. D.; Pollyea, D. A.; Chan, S. M.; Swords, R., Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia* **2017,** *31* (2), 272-281.
69. Chowdhury, R.; Yeoh, K. K.; Tian, Y.-M.; Hillringhaus, L.; Bagg, E. A.; Rose, N. R.; Leung, I. K. H.; Li, X. S.; Woon, E. C. Y.; Yang, M.; McDonough, M. A.; King, O. N.; Clifton, I. J.; Klose, R. J.; Claridge, T. D. W.; Ratcliffe, P. J.; Schofield, C. J.; Kawamura, A., The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO reports* **2011,** *12* (5), 463-469.
70. Xu, W.; Yang, H.; Liu, Y.; Yang, Y.; Wang, P.; Kim, S. H.; Ito, S.; Yang, C.; Wang, P.; Xiao, M. T.; Liu, L. X.; Jiang, W. Q.; Liu, J.; Zhang, J. Y.; Wang, B.; Frye, S.; Zhang, Y.; Xu, Y. H.; Lei, Q. Y.; Guan, K. L.; Zhao, S. M.; Xiong, Y., Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell* **2011,** *19* (1), 17-30.
71. DiNardo, C. D.; Stein, E. M.; de Botton, S.; Roboz, G. J.; Altman, J. K.; Mims, A. S.; Swords, R.; Collins, R. H.; Mannis, G. N.; Pollyea, D. A.; Donnellan, W.; Fathi, A. T.; Pigneux, A.; Erba, H. P.; Prince, G. T.; Stein, A. S.; Uy, G. L.; Foran, J. M.; Traer, E.; Stuart, R. K.; Arellano, M. L.; Slack, J. L.; Sekeres, M. A.; Willekens, C.; Choe, S.; Wang, H.; Zhang, V.; Yen, K. E.; Kapsalis, S. M.; Yang, H.; Dai, D.; Fan, B.; Goldwasser, M.; Liu, H.; Agresta, S.; Wu, B.; Attar, E. C.; Tallman, M. S.; Stone, R. M.; Kantarjian, H. M., Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *New England Journal of Medicine* **2018,** *378* (25), 2386-2398.
72. Stein, E. M.; DiNardo, C. D.; Pollyea, D. A.; Fathi, A. T.; Roboz, G. J.; Altman, J. K.; Stone, R. M.; DeAngelo, D. J.; Levine, R. L.; Flinn, I. W.; Kantarjian, H. M.; Collins, R.; Patel, M. R.; Frankel, A. E.; Stein, A.; Sekeres, M. A.; Swords, R. T.; Medeiros, B. C.; Willekens, C.; Vyas, P.; Tosolini, A.; Xu, Q.; Knight, R. D.; Yen, K. E.; Agresta, S.; de Botton, S.; Tallman, M.

S., Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **2017,** *130* (6), 722-731.
73. Kim, E. S., Enasidenib: First Global Approval. *Drugs* **2017,** *77* (15), 1705-1711.
74. Xie, X.; Baird, D.; Bowen, K.; Capka, V.; Chen, J.; Chenail, G.; Cho, Y.; Dooley, J.; Farsidjani, A.; Fortin, P.; Kohls, D.; Kulathila, R.; Lin, F.; McKay, D.; Rodrigues, L.; Sage, D.; Toure, B. B.; van der Plas, S.; Wright, K.; Xu, M.; Yin, H.; Levell, J.; Pagliarini, R. A., Allosteric Mutant IDH1 Inhibitors Reveal Mechanisms for IDH1 Mutant and Isoform Selectivity. *Structure* **2017,** *25* (3), 506-513.
75. Amatangelo, M. D.; Quek, L.; Shih, A.; Stein, E. M.; Roshal, M.; David, M. D.; Marteyn, B.; Farnoud, N. R.; de Botton, S.; Bernard, O. A.; Wu, B.; Yen, K. E.; Tallman, M. S.; Papaemmanuil, E.; Penard-Lacronique, V.; Thakurta, A.; Vyas, P.; Levine, R. L., Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood* **2017,** *130* (6), 732-741.
76. Bross, P. F.; Beitz, J.; Chen, G.; Chen, X. H.; Duffy, E.; Kieffer, L.; Roy, S.; Sridhara, R.; Rahman, A.; Williams, G.; Pazdur, R., Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2001,** *7* (6), 1490-6.
77. Petersdorf, S. H.; Kopecky, K. J.; Slovak, M.; Willman, C.; Nevill, T.; Brandwein, J.; Larson, R. A.; Erba, H. P.; Stiff, P. J.; Stuart, R. K.; Walter, R. B.; Tallman, M. S.; Stenke, L.; Appelbaum, F. R., A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **2013,** *121* (24), 4854-4860.
78. Petersdorf, S.; Kopecky, K.; Stuart, R. K.; Larson, R. A.; Nevill, T. J.; Stenke, L.; Slovak, M. L.; Tallman, M. S.; Willman, C. L.; Erba, H.; Appelbaum, F. R., Preliminary Results of Southwest Oncology Group Study S0106: An International Intergroup Phase 3 Randomized Trial Comparing the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Standard Induction Therapy Versus Standard Induction Therapy Followed by a Second Randomization to Post-Consolidation Gemtuzumab Ozogamicin Versus No Additional Therapy for Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2009,** *114* (22), 790-790.
79. Giles, F. J.; Kantarjian, H. M.; Kornblau, S. M.; Thomas, D. A.; Garcia-Manero, G.; Waddelow, T. A.; David, C. L.; Phan, A. T.; Colburn, D. E.; Rashid, A.; Estey, E. H., Mylotarg™ (gemtuzumab ozogamicin) therapy is associated with hepatic venoocclusive disease in patients who have not received stem cell transplantation. *Cancer* **2001,** *92* (2), 406-413.
80. Jen, E. Y.; Ko, C.-W.; Lee, J. E.; Del Valle, P. L.; Aydanian, A.; Jewell, C.; Norsworthy, K. J.; Przepiorka, D.; Nie, L.; Liu, J.; Sheth, C. M.; Shapiro, M.; Farrell, A. T.; Pazdur, R., FDA

Approval: Gemtuzumab ozogamicin for the treatment of adults with newly-diagnosed CD33-positive acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* **2018**.

81. Lambert, J.; Pautas, C.; Terré, C.; Raffoux, E.; Turlure, P.; Caillot, D.; Legrand, O.; Thomas, X.; Gardin, C.; Gogat-Marchant, K.; Rubin, S. D.; Benner, R. J.; Bousset, P.; Preudhomme, C.; Chevret, S.; Dombret, H.; Castaigne, S., Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase 3 ALFA-0701 trial. *Haematologica* **2018**.

82. Ellestad, G. A., Structural and conformational features relevant to the anti-tumor activity of calicheamicin γ. *Chirality* **2011,** *23* (8), 660-671.

83. Jope, R. S.; Johnson, G. V. W., The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences* **2004,** *29* (2), 95-102.

84. Banerji, V.; Frumm, S. M.; Ross, K. N.; Li, L. S.; Schinzel, A. C.; Hahn, C. K.; Kakoza, R. M.; Chow, K. T.; Ross, L.; Alexe, G.; Tolliday, N.; Inguilizian, H.; Galinsky, I.; Stone, R. M.; DeAngelo, D. J.; Roti, G.; Aster, J. C.; Hahn, W. C.; Kung, A. L.; Stegmaier, K., The intersection of genetic and chemical genomic screens identifies GSK-3α as a target in human acute myeloid leukemia. *The Journal of clinical investigation* **2012,** *122* (3), 935-947.

85. Zassadowski, F.; Pokorna, K.; Ferre, N.; Guidez, F.; Llopis, L.; Chourbagi, O.; Chopin, M.; Poupon, J.; Fenaux, P.; Ann Padua, R.; Pla, M.; Chomienne, C.; Cassinat, B., Lithium chloride antileukemic activity in acute promyelocytic leukemia is GSK-3 and MEK/ERK dependent. *Leukemia* **2015,** *29*, 2277.

86. Wagner, F. F.; Benajiba, L.; Campbell, A. J.; Weiwer, M.; Sacher, J. R.; Gale, J. P.; Ross, L.; Puissant, A.; Alexe, G.; Conway, A.; Back, M.; Pikman, Y.; Galinsky, I.; DeAngelo, D. J.; Stone, R. M.; Kaya, T.; Shi, X.; Robers, M. B.; Machleidt, T.; Wilkinson, J.; Hermine, O.; Kung, A.; Stein, A. J.; Lakshminarasimhan, D.; Hemann, M. T.; Scolnick, E.; Zhang, Y. L.; Pan, J. Q.; Stegmaier, K.; Holson, E. B., Exploiting an Asp-Glu "switch" in glycogen synthase kinase 3 to design paralog-selective inhibitors for use in acute myeloid leukemia. *Science translational medicine* **2018,** *10* (431).

87. Neumann, T.; Benajiba, L.; Goring, S.; Stegmaier, K.; Schmidt, B., Evaluation of Improved Glycogen Synthase Kinase-3alpha Inhibitors in Models of Acute Myeloid Leukemia. *Journal of medicinal chemistry* **2015,** *58* (22), 8907-19.

88. Lahiry, P.; Torkamani, A.; Schork, N. J.; Hegele, R. A., Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nature reviews. Genetics* **2010,** *11* (1), 60-74.

89. Shoji, S.; Parmelee, D. C.; Wade, R. D.; Kumar, S.; Ericsson, L. H.; Walsh, K. A.; Neurath, H.; Long, G. L.; Demaille, J. G.; Fischer, E. H.; Titani, K., Complete amino acid

sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981,** *78* (2), 848-851.

90. Knighton, D.; Zheng, J.; Ten Eyck, L.; Ashford, V.; Xuong, N.; Taylor, S.; Sowadski, J., Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science (New York, N.Y.)* **1991,** *253* (5018), 407-414.

91. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S., The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)* **2002,** *298* (5600), 1912-34.

92. Cheek, S.; Zhang, H.; Grishin, N. V., Sequence and structure classification of kinases. *Journal of molecular biology* **2002,** *320* (4), 855-81.

93. Eid, S.; Turk, S.; Volkamer, A.; Rippmann, F.; Fulle, S., KinMap: a web-based tool for interactive navigation through human kinome data. *BMC Bioinformatics* **2017,** *18* (1), 16.

94. McClendon, C. L.; Kornev, A. P.; Gilson, M. K.; Taylor, S. S., Dynamic architecture of a protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014,** *111* (43), E4623-E4631.

95. Mol, C. D.; Lim, K. B.; Sridhar, V.; Zou, H.; Chien, E. Y.; Sang, B. C.; Nowakowski, J.; Kassel, D. B.; Cronin, C. N.; McRee, D. E., Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *The Journal of biological chemistry* **2003,** *278* (34), 31461-4.

96. Mol, C. D.; Dougan, D. R.; Schneider, T. R.; Skene, R. J.; Kraus, M. L.; Scheibe, D. N.; Snell, G. P.; Zou, H.; Sang, B. C.; Wilson, K. P., Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* **2004,** *279* (30), 31655-63.

97. Maruyama, I. N., Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells* **2014,** *3* (2), 304-30.

98. Kim, S.; Alsaidan, O. A.; Goodwin, O.; Li, Q.; Sulejmani, E.; Han, Z.; Bai, A.; Albers, T.; Beharry, Z.; Zheng, Y. G.; Norris, J. S.; Szulc, Z. M.; Bielawska, A.; Lebedyeva, I.; Pegan, S. D.; Cai, H., Blocking Myristoylation of Src Inhibits Its Kinase Activity and Suppresses Prostate Cancer Progression. *Cancer research* **2017,** *77* (24), 6950-6962.

99. Gharwan, H.; Groninger, H., Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2015,** *13*, 209.

100. Riese, D. J., 2nd, Ligand-based receptor tyrosine kinase partial agonists: New paradigm for cancer drug discovery? *Expert opinion on drug discovery* **2011,** *6* (2), 185-193.

101. Dar, A. C.; Shokat, K. M., The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2011,** *80* (1), 769-795.

102. Vandana, L.; Indraneel, G., New Directions in Targeting Protein Kinases: Focusing Upon True Allosteric and Bivalent Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design* **2012,** *18* (20), 2936-2945.
103. Roskoski, R., Jr., Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological research* **2016,** *103*, 26-48.
104. Cohen, M. H.; Williams, G.; Johnson, J. R.; Duan, J.; Gobburu, J.; Rahman, A.; Benson, K.; Leighton, J.; Kim, S. K.; Wood, R.; Rothmann, M.; Chen, G.; U, K. M.; Staten, A. M.; Pazdur, R., Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2002,** *8* (5), 935-42.
105. Lugo, T.; Pendergast, A.; Muller, A.; Witte, O., Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science (New York, N.Y.)* **1990,** *247* (4946), 1079-1082.
106. Cohen, M. H.; Johnson, J. R.; Justice, R.; Pazdur, R., Approval summary: imatinib mesylate for one or three years in the adjuvant treatment of gastrointestinal stromal tumors. *The oncologist* **2012,** *17* (7), 992-7.
107. Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Floersheimer, A.; Furet, P.; Liebetanz, J.; Rummel, G.; Rheinberger, P.; Centeleghe, M.; Fabbro, D.; Manley, P. W., Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. *Acta Crystallographica Section D* **2007,** *63* (1), 80-93.
108. Nakano, H.; Omura, S., Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine. *The Journal of antibiotics* **2009,** *62* (1), 17-26.
109. Meyer, T.; Regenass, U.; Fabbro, D.; Alteri, E.; Röusel, J.; Möller, M.; Caravatti, G.; Matter, A., A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and In vitro anti-proliferative as well as In vivo anti-tumor activity. *International Journal of Cancer* **1989,** *43* (5), 851-856.
110. Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P., A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* **2008,** *26*, 127.
111. Martin, M. P.; Alam, R.; Betzi, S.; Ingles, D. J.; Zhu, J.-Y.; Schönbrunn, E., A Novel Approach to the Discovery of Small-Molecule Ligands of CDK2. *ChemBioChem* **2012,** *13* (14), 2128-2136.
112. Demetri, G. D.; van Oosterom, A. T.; Garrett, C. R.; Blackstein, M. E.; Shah, M. H.; Verweij, J.; McArthur, G.; Judson, I. R.; Heinrich, M. C.; Morgan, J. A.; Desai, J.; Fletcher, C.

D.; George, S.; Bello, C. L.; Huang, X.; Baum, C. M.; Casali, P. G., Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* **2006,** *368* (9544), 1329-38.

113. Roskoski, R., Jr., Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* **2007,** *356* (2), 323-8.

114. Gajiwala, K. S.; Wu, J. C.; Christensen, J.; Deshmukh, G. D.; Diehl, W.; DiNitto, J. P.; English, J. M.; Greig, M. J.; He, Y.-A.; Jacques, S. L.; Lunney, E. A.; McTigue, M.; Molina, D.; Quenzer, T.; Wells, P. A.; Yu, X.; Zhang, Y.; Zou, A.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G.; Zhang, H.-M.; Demetri, G. D., KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009,** *106* (5), 1542-1547.

115. McTigue, M.; Murray, B. W.; Chen, J. H.; Deng, Y.-L.; Solowiej, J.; Kania, R. S., Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012,** *109* (45), 18281-18289.

116. Tanramluk, D.; Schreyer, A.; Pitt, W. R.; Blundell, T. L., On the origins of enzyme inhibitor selectivity and promiscuity: a case study of protein kinase binding to staurosporine. *Chemical biology & drug design* **2009,** *74* (1), 16-24.

117. Randrup Hansen, C.; Grimm, D.; Bauer, J.; Wehland, M.; Magnusson, N. E., Effects and Side Effects of Using Sorafenib and Sunitinib in the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *International journal of molecular sciences* **2017,** *18* (2).

118. Lonsdale, R.; Ward, R. A., Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chemical Society Reviews* **2018,** *47* (11), 3816-3830.

119. Bauer, R. A., Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discovery Today* **2015,** *20* (9), 1061-1073.

120. Strelow, J. M., A Perspective on the Kinetics of Covalent and Irreversible Inhibition. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D* **2017,** *22* (1), 3-20.

121. Flanagan, M. E.; Abramite, J. A.; Anderson, D. P.; Aulabaugh, A.; Dahal, U. P.; Gilbert, A. M.; Li, C.; Montgomery, J.; Oppenheimer, S. R.; Ryder, T.; Schuff, B. P.; Uccello, D. P.; Walker, G. S.; Wu, Y.; Brown, M. F.; Chen, J. M.; Hayward, M. M.; Noe, M. C.; Obach, R. S.; Philippe, L.; Shanmugasundaram, V.; Shapiro, M. J.; Starr, J.; Stroh, J.; Che, Y., Chemical and Computational Methods for the Characterization of Covalent Reactive Groups for the Prospective Design of Irreversible Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2014,** *57* (23), 10072-10079.

122. Shin, J. M.; Kim, N., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. *Journal of neurogastroenterology and motility* **2013,** *19* (1), 25-35.
123. Hollopeter, G.; Jantzen, H.-M.; Vincent, D.; Li, G.; England, L.; Ramakrishnan, V.; Yang, R.-B.; Nurden, P.; Nurden, A.; Julius, D.; Conley, P. B., Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **2001,** *409*, 202.
124. Lei, J.; Zhou, Y.; Xie, D.; Zhang, Y., Mechanistic insights into a classic wonder drug--aspirin. *Journal of the American Chemical Society* **2015,** *137* (1), 70-73.
125. Yocum, R. R.; Rasmussen, J. R.; Strominger, J. L., The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of Bacillus stearothermophilus D-alanine carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry* **1980,** *255* (9), 3977-86.
126. Barf, T.; Kaptein, A., Irreversible Protein Kinase Inhibitors: Balancing the Benefits and Risks. *Journal of medicinal chemistry* **2012,** *55* (14), 6243-6262.
127. Liu, Q.; Sabnis, Y.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Buhrlage, S. J.; Jones, L. H.; Gray, N. S., Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. *Chemistry & biology* **2013,** *20* (2), 146-59.
128. Pettinger, J.; Jones, K.; Cheeseman, M. D., Lysine-Targeting Covalent Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **2017,** *56* (48), 15200-15209.
129. Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö. D.; James, K. E., Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chemical Reviews* **2002,** *102* (12), 4639-4750.
130. Lin, S.; Yang, X.; Jia, S.; Weeks, A. M.; Hornsby, M.; Lee, P. S.; Nichiporuk, R. V.; Iavarone, A. T.; Wells, J. A.; Toste, F. D.; Chang, C. J., Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation. *Science (New York, N.Y.)* **2017,** *355* (6325), 597-602.
131. Kharenko, O. A.; Patel, R. G.; Brown, S. D.; Calosing, C.; White, A.; Lakshminarasimhan, D.; Suto, R. K.; Duffy, B. C.; Kitchen, D. B.; McLure, K. G.; Hansen, H. C.; van der Horst, E. H.; Young, P. R., Design and Characterization of Novel Covalent Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Inhibitors Targeting a Methionine. *Journal of medicinal chemistry* **2018,** *61* (18), 8202-8211.
132. Ojima, M.; Inada, Y.; Shibouta, Y.; Wada, T.; Sanada, T.; Kubo, K.; Nishikawa, K., Candesartan (CV-11974) dissociates slowly from the angiotensin AT1 receptor. *European Journal of Pharmacology* **1997,** *319* (1), 137-146.
133. King, N. M.; Prabu-Jeyabalan, M.; Nalivaika, E. A.; Wigerinck, P.; de Béthune, M.-P.; Schiffer, C. A., Structural and Thermodynamic Basis for the Binding of TMC114, a Next-Generation Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor. *Journal of Virology* **2004,** *78* (21), 12012-12021.

134. Adams, J.; Kauffman, M., Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer investigation* **2004,** *22* (2), 304-11.
135. Bradshaw, J. M.; McFarland, J. M.; Paavilainen, V. O.; Bisconte, A.; Tam, D.; Phan, V. T.; Romanov, S.; Finkle, D.; Shu, J.; Patel, V.; Ton, T.; Li, X.; Loughhead, D. G.; Nunn, P. A.; Karr, D. E.; Gerritsen, M. E.; Funk, J. O.; Owens, T. D.; Verner, E.; Brameld, K. A.; Hill, R. J.; Goldstein, D. M.; Taunton, J., Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors. *Nature chemical biology* **2015,** *11* (7), 525-31.
136. Hixson, S. H.; Hurwitz, J. L.; Langridge, K. J.; Nichols, D. C.; Provost, K. M.; Wolff, A. M., Photoaffinity reagents for use with pepsin and other carboxyl proteases. *Biochemical and biophysical research communications* **1983,** *111* (2), 630-635.
137. Lin, N. U.; Winer, E. P.; Wheatley, D.; Carey, L. A.; Houston, S.; Mendelson, D.; Munster, P.; Frakes, L.; Kelly, S.; Garcia, A. A.; Cleator, S.; Uttenreuther-Fischer, M.; Jones, H.; Wind, S.; Vinisko, R.; Hickish, T., A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. *Breast cancer research and treatment* **2012,** *133* (3), 1057-1065.
138. Li, D.; Ambrogio, L.; Shimamura, T.; Kubo, S.; Takahashi, M.; Chirieac, L. R.; Padera, R. F.; Shapiro, G. I.; Baum, A.; Himmelsbach, F.; Rettig, W. J.; Meyerson, M.; Solca, F.; Greulich, H.; Wong, K. K., BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **2008,** *27* (34), 4702-4711.
139. Baselga, J.; Coleman, R. E.; Cortés, J.; Janni, W., Advances in the management of HER2-positive early breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* **2017,** *119*, 113-122.
140. Deeks, E. D., Ibrutinib: A Review in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Drugs* **2017,** *77* (2), 225-236.
141. Solca, F.; Dahl, G.; Zoephel, A.; Bader, G.; Sanderson, M.; Klein, C.; Kraemer, O.; Himmelsbach, F.; Haaksma, E.; Adolf, G. R., Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2012,** *343* (2), 342-50.
142. Yun, C. H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K. K.; Meyerson, M.; Eck, M. J., The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008,** *105* (6), 2070-5.
143. Bender, A. T.; Gardberg, A.; Pereira, A.; Johnson, T.; Wu, Y.; Grenningloh, R.; Head, J.; Morandi, F.; Haselmayer, P.; Liu-Bujalski, L., Ability of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors to Sequester Y551 and Prevent Phosphorylation Determines Potency for Inhibition of Fc Receptor but not B-Cell Receptor Signaling. *Molecular Pharmacology* **2017,** *91* (3), 208-219.

144. Sherr, C. J.; Rettenmier, C. W., The fms gene and the CSF-1 receptor. *Cancer surveys* **1986,** *5* (2), 221-32.
145. Grafone, T.; Palmisano, M.; Nicci, C.; Storti, S., An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology reviews* **2012,** *6* (1), e8-e8.
146. Takahashi, S., Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology* **2011,** *4*, 13-13.
147. Lagunas-Rangel, F. A.; Chavez-Valencia, V., FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)* **2017,** *34* (6), 114.
148. Yanada, M.; Matsuo, K.; Suzuki, T.; Kiyoi, H.; Naoe, T., Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* **2005,** *19*, 1345.
149. Mead, A. J.; Kharazi, S.; Atkinson, D.; Macaulay, I.; Pecquet, C.; Loughran, S.; Lutteropp, M.; Woll, P.; Chowdhury, O.; Luc, S.; Buza-Vidas, N.; Ferry, H.; Clark, S.-A.; Goardon, N.; Vyas, P.; Constantinescu, S. N.; Sitnicka, E.; Nerlov, C.; Jacobsen, S. E. W., FLT3-ITDs instruct a myeloid differentiation and transformation bias in lymphomyeloid multipotent progenitors. *Cell reports* **2013,** *3* (6), 1766-1776.
150. Williams, B.; Atkins, A.; Zhang, H.; Lu, D.; Jimenez, X.; Li, H.; Wang, M. N.; Ludwig, D.; Balderes, P.; Witte, L.; Li, Y.; Zhu, Z., Cell-based selection of internalizing fully human antagonistic antibodies directed against FLT3 for suppression of leukemia cell growth. *Leukemia* **2005,** *19*, 1432.
151. Durben, M.; Schmiedel, D.; Hofmann, M.; Vogt, F.; Nubling, T.; Pyz, E.; Buhring, H. J.; Rammensee, H. G.; Salih, H. R.; Grosse-Hovest, L.; Jung, G., Characterization of a bispecific FLT3 X CD3 antibody in an improved, recombinant format for the treatment of leukemia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2015,** *23* (4), 648-55.
152. Wilhelm, S. M.; Carter, C.; Tang, L.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; Cao, Y.; Shujath, J.; Gawlak, S.; Eveleigh, D.; Rowley, B.; Liu, L.; Adnane, L.; Lynch, M.; Auclair, D.; Taylor, I.; Gedrich, R.; Voznesensky, A.; Riedl, B.; Post, L. E.; Bollag, G.; Trail, P. A., BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer research* **2004,** *64* (19), 7099-109.
153. Uy, G. L.; Mandrekar, S. J.; Laumann, K.; Marcucci, G.; Zhao, W.; Levis, M. J.; Klepin, H. D.; Baer, M. R.; Powell, B. L.; Westervelt, P.; DeAngelo, D. J.; Stock, W.; Sanford, B.; Blum, W. G.; Bloomfield, C. D.; Stone, R. M.; Larson, R. A., A phase 2 study incorporating sorafenib

into the chemotherapy for older adults with FLT3-mutated acute myeloid leukemia: CALGB 11001. *Blood advances* **2017,** *1* (5), 331-340.

154. Ravandi, F.; Cortes, J. E.; Jones, D.; Faderl, S.; Garcia-Manero, G.; Konopleva, M. Y.; O'Brien, S.; Estrov, Z.; Borthakur, G.; Thomas, D.; Pierce, S. R.; Brandt, M.; Byrd, A.; Bekele, B. N.; Pratz, K.; Luthra, R.; Levis, M.; Andreeff, M.; Kantarjian, H. M., Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2010,** *28* (11), 1856-1862.

155. Rock, E. P.; Goodman, V.; Jiang, J. X.; Mahjoob, K.; Verbois, S. L.; Morse, D.; Dagher, R.; Justice, R.; Pazdur, R., Food and Drug Administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *The oncologist* **2007,** *12* (1), 107-13.

156. Sun, L.; Liang, C.; Shirazian, S.; Zhou, Y.; Miller, T.; Cui, J.; Fukuda, J. Y.; Chu, J. Y.; Nematalla, A.; Wang, X.; Chen, H.; Sistla, A.; Luu, T. C.; Tang, F.; Wei, J.; Tang, C., Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2- dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4- dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Journal of medicinal chemistry* **2003,** *46* (7), 1116-9.

157. Chu, T. F.; Rupnick, M. A.; Kerkela, R.; Dallabrida, S. M.; Zurakowski, D.; Nguyen, L.; Woulfe, K.; Pravda, E.; Cassiola, F.; Desai, J.; George, S.; Morgan, J. A.; Harris, D. M.; Ismail, N. S.; Chen, J.-H.; Schoen, F. J.; Van den Abbeele, A. D.; Demetri, G. D.; Force, T.; Chen, M. H., Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet (London, England)* **2007,** *370* (9604), 2011-2019.

158. Fiedler, W.; Serve, H.; Döhner, H.; Schwittay, M.; Ottmann, O. G.; O'Farrell, A.-M.; Bello, C. L.; Allred, R.; Manning, W. C.; Cherrington, J. M.; Louie, S. G.; Hong, W.; Brega, N. M.; Massimini, G.; Scigalla, P.; Berdel, W. E.; Hossfeld, D. K., A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* **2005,** *105* (3), 986-993.

159. Zarrinkar, P. P.; Gunawardane, R. N.; Cramer, M. D.; Gardner, M. F.; Brigham, D.; Belli, B.; Karaman, M. W.; Pratz, K. W.; Pallares, G.; Chao, Q.; Sprankle, K. G.; Patel, H. K.; Levis, M.; Armstrong, R. C.; James, J.; Bhagwat, S. S., AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood* **2009,** *114* (14), 2984-92.

160. Levis, M., Quizartinib for the treatment of FLT3/ITD acute myeloid leukemia. *Future oncology (London, England)* **2014,** *10* (9), 1571-9.

161. Kelly, L. M.; Yu, J. C.; Boulton, C. L.; Apatira, M.; Li, J.; Sullivan, C. M.; Williams, I.; Amaral, S. M.; Curley, D. P.; Duclos, N.; Neuberg, D.; Scarborough, R. M.; Pandey, A.; Hollenbach, S.; Abe, K.; Lokker, N. A.; Gilliland, D. G.; Giese, N. A., CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer cell* **2002,** *1* (5), 421-32.
162. Stone, R. M.; Mandrekar, S. J.; Sanford, B. L.; Laumann, K.; Geyer, S.; Bloomfield, C. D.; Thiede, C.; Prior, T. W.; Döhner, K.; Marcucci, G.; Lo-Coco, F.; Klisovic, R. B.; Wei, A.; Sierra, J.; Sanz, M. A.; Brandwein, J. M.; de Witte, T.; Niederwieser, D.; Appelbaum, F. R.; Medeiros, B. C.; Tallman, M. S.; Krauter, J.; Schlenk, R. F.; Ganser, A.; Serve, H.; Ehninger, G.; Amadori, S.; Larson, R. A.; Döhner, H., Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New England Journal of Medicine* **2017,** *377* (5), 454-464.
163. Pratz, K.; Cherry, M.; Altman, J. K.; Cooper, B. W.; Cruz, J. C.; Jurcic, J. G.; Levis, M. J.; Lin, T. L.; Perl, A. E.; Podoltsev, N. A.; Schiller, G. J.; Liu, C.; Bahceci, E., Preliminary Results from a Phase 1 Study of Gilteritinib in Combination with Induction and Consolidation Chemotherapy in Subjects with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* **2017,** *130* (Suppl 1), 722-722.
164. Ohanian, M.; Kantarjian, H. M.; Borthakur, G.; Kadia, T. M.; Konopleva, M.; Garcia-Manero, G.; Estrov, Z.; Ferrajoli, A.; Takahashi, K.; Jabbour, E. J.; Daver, N.; Kornblau, S. M.; Wierda, W. G.; Burger, J. A.; Naqvi, K.; Benton, C. B.; Bose, P.; Eckardt, J. R.; Ravandi, F.; Cortes, J. E., Efficacy of a Type I FLT3 Inhibitor, Crenolanib, with Idarubicin and High-Dose Ara-C in Multiply Relapsed/Refractory FLT3+ AML. *Blood* **2016,** *128* (22), 2744-2744.
165. Galanis, A.; Ma, H.; Rajkhowa, T.; Ramachandran, A.; Small, D.; Cortes, J.; Levis, M., Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood* **2014,** *123* (1), 94-100.
166. Stone, R. M.; Collins, R.; Tallman, M. S.; Walter, R. B.; Karanes, C.; Patel, P. A.; Vusirikala, M.; Coombs, C. C.; Olson, G.; Jain, V. K.; Wang, E. S., Effect of cytarabine/anthracycline/crenolanib induction on minimal residual disease (MRD) in newly diagnosed FLT3 mutant AML. *Journal of Clinical Oncology* **2017,** *35* (15_suppl), 7016-7016.
167. Cortes, J. E.; Kantarjian, H. M.; Kadia, T. M.; Borthakur, G.; Konopleva, M.; Garcia-Manero, G.; Daver, N. G.; Pemmaraju, N.; Jabbour, E.; Estrov, Z.; Ramachandran, A.; Paradela, J.; Pond, B.; Ravandi, F.; Vusirikala, M.; Patel, P. A.; Levis, M. J.; Perl, A. E.; Andreeff, M.; Collins, R., Crenolanib besylate, a type I pan-FLT3 inhibitor, to demonstrate clinical activity in multiply relapsed FLT3-ITD and D835 AML. *Journal of Clinical Oncology* **2016,** *34* (15_suppl), 7008-7008.

168. Schirmer, A.; Kennedy, J.; Murli, S.; Reid, R.; Santi, D. V., Targeted covalent inactivation of protein kinases by resorcylic acid lactone polyketides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006,** *103* (11), 4234-4239.
169. Borthakur, G.; Gao, C.; Chen, Y.; Lan, Y. S.; Ruvolo, V. R.; Nomoto, K.; Zhao, N.; Konopleva, M.; Andreeff, M., Study Of Activity Of E6201, a Dual FLT3 and MEK Inhibitor, In Acute Myelogenous Leukemia With FLT3 Or RAS Mutation. *Blood* **2013,** *122* (21), 2683-2683.
170. Babiker, H. M.; Byron, S. A.; Hendricks, W. P. D.; Elmquist, W. F.; Gampa, G.; Vondrak, J.; Aldrich, J.; Cuyugan, L.; Adkins, J.; De Luca, V.; Tibes, R.; Borad, M. J.; Marceau, K.; Myers, T. J.; Paradiso, L. J.; Liang, W. S.; Korn, R. L.; Cridebring, D.; Von Hoff, D. D.; Carpten, J. D.; Craig, D. W.; Trent, J. M.; Gordon, M. S., E6201, an intravenous MEK1 inhibitor, achieves an exceptional response in BRAF V600E-mutated metastatic malignant melanoma with brain metastases. *Investigational new drugs* **2018**.
171. Muramoto, K.; Goto, M.; Inoue, Y.; Ishii, N.; Chiba, K.; Kuboi, Y.; Omae, T.; Wang, Y. J.; Gusovsky, F.; Shirota, H., E6201, a novel kinase inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-1 and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase-1: in vivo effects on cutaneous inflammatory responses by topical administration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2010,** *335* (1), 23-31.
172. Pricl, S.; Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Tamborini, E., T315I-mutated Bcr-Abl in chronic myeloid leukemia and imatinib: insights from a computational study. *Molecular cancer therapeutics* **2005,** *4* (8), 1167-74.
173. Gleixner, K. V.; Dinu, G. E.; Greiner, G.; Wimazal, F.; Hadzijusufovic, E.; Mitterbauer, G.; Mannhalter, C.; Valent, P.; Sperr, W. R., KIT D816V Mutation Burden Predicts Prognosis and Survival In Patients With Mastocytosis and Correlates With The WHO Type Of The Disease. *Blood* **2013,** *122* (21), 4052-4052.
174. Varshavsky, A., The Ubiquitin System, Autophagy, and Regulated Protein Degradation. *Annu Rev Biochem* **2017,** *86*, 123-128.
175. Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D.; Huber, R., Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature* **1997,** *386* (6624), 463-71.
176. Kravtsova-Ivantsiv, Y.; Ciechanover, A., The ubiquitin-proteasome system and activation of NF-κB: involvement of the ubiquitin ligase KPC1 in p105 processing and tumor suppression. *Molecular & cellular oncology* **2015,** *2* (4), e1054552-e1054552.
177. Schrader, J.; Henneberg, F.; Mata, R. A.; Tittmann, K.; Schneider, T. R.; Stark, H.; Bourenkov, G.; Chari, A., The inhibition mechanism of human 20S

proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science (New York, N.Y.)* **2016,** *353* (6299), 594-598.
178. Herndon, T. M.; Deisseroth, A.; Kaminskas, E.; Kane, R. C.; Koti, K. M.; Rothmann, M. D.; Habtemariam, B.; Bullock, J.; Bray, J. D.; Hawes, J.; Palmby, T. R.; Jee, J.; Adams, W.; Mahayni, H.; Brown, J.; Dorantes, A.; Sridhara, R.; Farrell, A. T.; Pazdur, R., U.s. Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2013,** *19* (17), 4559-63.
179. Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H. B.; Elofsson, M.; Sin, N.; Crews, C. M., Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999,** *96* (18), 10403-10408.
180. Harshbarger, W.; Miller, C.; Diedrich, C.; Sacchettini, J., Crystal Structure of the Human 20S Proteasome in Complex with Carfilzomib. *Structure* **2015,** *23* (2), 418-424.
181. Moreau, P.; Masszi, T.; Grzasko, N.; Bahlis, N. J.; Hansson, M.; Pour, L.; Sandhu, I.; Ganly, P.; Baker, B. W.; Jackson, S. R.; Stoppa, A.-M.; Simpson, D. R.; Gimsing, P.; Palumbo, A.; Garderet, L.; Cavo, M.; Kumar, S.; Touzeau, C.; Buadi, F. K.; Laubach, J. P.; Berg, D. T.; Lin, J.; Di Bacco, A.; Hui, A.-M.; van de Velde, H.; Richardson, P. G., Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* **2016,** *374* (17), 1621-1634.
182. Avet-Loiseau, H.; Bahlis, N. J.; Chng, W.-J.; Masszi, T.; Viterbo, L.; Pour, L.; Ganly, P.; Palumbo, A.; Cavo, M.; Langer, C.; Pluta, A.; Nagler, A.; Kumar, S.; Ben-Yehuda, D.; Rajkumar, S. V.; San-Miguel, J.; Berg, D.; Lin, J.; van de Velde, H.; Esseltine, D.-L.; di Bacco, A.; Moreau, P.; Richardson, P. G., Ixazomib significantly prolongs progression-free survival in high-risk relapsed/refractory myeloma patients. *Blood* **2017,** *130* (24), 2610-2618.
183. Offidani, M.; Corvatta, L.; Caraffa, P.; Gentili, S.; Maracci, L.; Leoni, P., An evidence-based review of ixazomib citrate and its potential in the treatment of newly diagnosed multiple myeloma. *OncoTargets and therapy* **2014,** *7*, 1793-800.
184. Brayer, J.; Baz, R., The potential of ixazomib, a second-generation proteasome inhibitor, in the treatment of multiple myeloma. *Therapeutic advances in hematology* **2017,** *8* (7), 209-220.
185. Fitzpatrick, J. S.; Shahi, K.; Baudry, M., Effect of seizure activity and calpain inhibitor I on LTP in juvenile hippocampal slices. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **1992,** *10* (4), 313-9.
186. Mlynarczuk-Bialy, I.; Roeckmann, H.; Kuckelkorn, U.; Schmidt, B.; Umbreen, S.; Golab, J.; Ludwig, A.; Montag, C.; Wiebusch, L.; Hagemeier, C.; Schadendorf, D.; Kloetzel, P.

M.; Seifert, U., Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. *Cancer research* **2006,** *66* (15), 7598-605.

187. Stein, M. L.; Cui, H.; Beck, P.; Dubiella, C.; Voss, C.; Kruger, A.; Schmidt, B.; Groll, M., Systematic comparison of peptidic proteasome inhibitors highlights the alpha-ketoamide electrophile as an auspicious reversible lead motif. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014,** *53* (6), 1679-83.

188. Gräwert, M. A.; Gallastegui, N.; Stein, M.; Schmidt, B.; Kloetzel, P.-M.; Huber, R.; Groll, M., Elucidation of the α-Keto-Aldehyde Binding Mechanism: A Lead Structure Motif for Proteasome Inhibition. *Angewandte Chemie International Edition* **2011,** *50* (2), 542-544.

189. Braun, H. A.; Umbreen, S.; Groll, M.; Kuckelkorn, U.; Mlynarczuk, I.; Wigand, M. E.; Drung, I.; Kloetzel, P. M.; Schmidt, B., Tripeptide mimetics inhibit the 20 S proteasome by covalent bonding to the active threonines. *The Journal of biological chemistry* **2005,** *280* (31), 28394-401.

190. Voss, C.; Scholz, C.; Knorr, S.; Beck, P.; Stein, M. L.; Zall, A.; Kuckelkorn, U.; Kloetzel, P.-M.; Groll, M.; Hamacher, K.; Schmidt, B., α-Keto Phenylamides as P1′-Extended Proteasome Inhibitors. *ChemMedChem* **2014,** *9* (11), 2557-2564.

191. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* **2009,** *30* (16), 2785-2791.

192. Zhu, K.; Borrelli, K. W.; Greenwood, J. R.; Day, T.; Abel, R.; Farid, R. S.; Harder, E., Docking Covalent Inhibitors: A Parameter Free Approach To Pose Prediction and Scoring. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014,** *54* (7), 1932-1940.

193. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018. .

194. Scholz, C.; Knorr, S.; Hamacher, K.; Schmidt, B., DOCKTITE-a highly versatile step-by-step workflow for covalent docking and virtual screening in the molecular operating environment. *J Chem Inf Model* **2015,** *55* (2), 398-406.

195. Lovly, C. M.; Shaw, A. T., Molecular pathways: resistance to kinase inhibitors and implications for therapeutic strategies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2014,** *20* (9), 2249-2256.

196. Liu, T.; Lin, Y.; Wen, X.; Jorissen, R. N.; Gilson, M. K., BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. *Nucleic acids research* **2007,** *35* (Database issue), D198-D201.

197. Lawrence, H. R.; Martin, M. P.; Luo, Y.; Pireddu, R.; Yang, H.; Gevariya, H.; Ozcan, S.; Zhu, J.-Y.; Kendig, R.; Rodriguez, M.; Elias, R.; Cheng, J. Q.; Sebti, S. M.; Schonbrunn, E.;

Lawrence, N. J., Development of o-Chlorophenyl Substituted Pyrimidines as Exceptionally Potent Aurora Kinase Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2012,** *55* (17), 7392-7416.
198. Li, Z.; Wang, X.; Eksterowicz, J.; Gribble, M. W.; Alba, G. Q.; Ayres, M.; Carlson, T. J.; Chen, A.; Chen, X.; Cho, R.; Connors, R. V.; DeGraffenreid, M.; Deignan, J. T.; Duquette, J.; Fan, P.; Fisher, B.; Fu, J.; Huard, J. N.; Kaizerman, J.; Keegan, K. S.; Li, C.; Li, K.; Li, Y.; Liang, L.; Liu, W.; Lively, S. E.; Lo, M.-C.; Ma, J.; McMinn, D. L.; Mihalic, J. T.; Modi, K.; Ngo, R.; Pattabiraman, K.; Piper, D. E.; Queva, C.; Ragains, M. L.; Suchomel, J.; Thibault, S.; Walker, N.; Wang, X.; Wang, Z.; Wanska, M.; Wehn, P. M.; Weidner, M. F.; Zhang, A. J.; Zhao, X.; Kamb, A.; Wickramasinghe, D.; Dai, K.; McGee, L. R.; Medina, J. C., Discovery of AMG 925, a FLT3 and CDK4 Dual Kinase Inhibitor with Preferential Affinity for the Activated State of FLT3. *Journal of medicinal chemistry* **2014,** *57* (8), 3430-3449.
199. Bebbington, D.; Binch, H.; Charrier, J. D.; Everitt, S.; Fraysse, D.; Golec, J.; Kay, D.; Knegtel, R.; Mak, C.; Mazzei, F.; Miller, A.; Mortimore, M.; O'Donnell, M.; Patel, S.; Pierard, F.; Pinder, J.; Pollard, J.; Ramaya, S.; Robinson, D.; Rutherford, A.; Studley, J.; Westcott, J., The discovery of the potent aurora inhibitor MK-0457 (VX-680). *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009,** *19* (13), 3586-92.
200. William, A. D.; Lee, A. C. H.; Blanchard, S.; Poulsen, A.; Teo, E. L.; Nagaraj, H.; Tan, E.; Chen, D.; Williams, M.; Sun, E. T.; Goh, K. C.; Ong, W. C.; Goh, S. K.; Hart, S.; Jayaraman, R.; Pasha, M. K.; Ethirajulu, K.; Wood, J. M.; Dymock, B. W., Discovery of the Macrocycle 11-(2-Pyrrolidin-1-yl-ethoxy)-14,19-dioxa-5,7,26-triaza-tetracyclo[19.3.1.1(2,6).1(8,12)]heptacosa-1(25),2(26),3,5,8,10,12(27),16,21,23-decaene (SB1518), a Potent Janus Kinase 2/Fms-Like Tyrosine Kinase-3 (JAK2/FLT3) Inhibitor for the Treatment of Myelofibrosis and Lymphoma. *Journal of medicinal chemistry* **2011,** *54* (13), 4638-4658.
201. Poulsen, A.; Blanchard, S.; Soh, C. K.; Lee, C.; Williams, M.; Wang, H.; Dymock, B., Structure-based design of PDK1 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012,** *22* (1), 305-7.
202. Goodfellow, V. S.; Loweth, C. J.; Ravula, S. B.; Wiemann, T.; Nguyen, T.; Xu, Y.; Todd, D. E.; Sheppard, D.; Pollack, S.; Polesskaya, O.; Marker, D. F.; Dewhurst, S.; Gelbard, H. A., Discovery, synthesis, and characterization of an orally bioavailable, brain penetrant inhibitor of mixed lineage kinase 3. *Journal of medicinal chemistry* **2013,** *56* (20), 8032-48.
203. Yee, K. W. H.; O'Farrell, A. M.; Smolich, B. D.; Cherrington, J. M.; McMahon, G.; Wait, C. L.; McGreevey, L. S.; Griffith, D. J.; Heinrich, M. C., SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* **2002,** *100* (8), 2941-2949.

204. O'Farrell, A. M.; Abrams, T. J.; Yuen, H. A.; Ngai, T. J.; Louie, S. G.; Yee, K. W.; Wong, L. M.; Hong, W.; Lee, L. B.; Town, A.; Smolich, B. D.; Manning, W. C.; Murray, L. J.; Heinrich, M. C.; Cherrington, J. M., SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* **2003,** *101* (9), 3597-605.

205. Amombo, G. M.; Kramer, T.; Lo Monte, F.; Goring, S.; Fach, M.; Smith, S.; Kolb, S.; Schubenel, R.; Baumann, K.; Schmidt, B., Modification of a promiscuous inhibitor shifts the inhibition from gamma-secretase to FLT-3. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012,** *22* (24), 7634-40.

206. Chen, L. S.; Redkar, S.; Taverna, P.; Cortes, J. E.; Gandhi, V., Mechanisms of cytotoxicity to Pim kinase inhibitor, SGI-1776, in acute myeloid leukemia. *Blood* **2011,** *118* (3), 693-702.

207. Smith, C. C.; Lasater, E. A.; Lin, K. C.; Wang, Q.; McCreery, M. Q.; Stewart, W. K.; Damon, L. E.; Perl, A. E.; Jeschke, G. R.; Sugita, M.; Carroll, M.; Kogan, S. C.; Kuriyan, J.; Shah, N. P., Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014,** *111* (14), 5319-5324.

208. Machrouhi, F.; Ouhamou, N.; Laderoute, K.; Calaoagan, J.; Bukhtiyarova, M.; Ehrlich, P. J.; Klon, A. E., The rational design of a novel potent analogue of the 5'-AMP-activated protein kinase inhibitor compound C with improved selectivity and cellular activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010,** *20* (22), 6394-9.

209. Li, W.-W.; Chen, J.-J.; Zheng, R.-L.; Zhang, W.-Q.; Cao, Z.-X.; Yang, L.-L.; Qing, X.-Y.; Zhou, L.-X.; Yang, L.; Yu, L.-D.; Chen, L.-J.; Wei, Y.-Q.; Yang, S.-Y., Taking Quinazoline as a General Support-Nog to Design Potent and Selective Kinase Inhibitors: Application to FMS-like Tyrosine Kinase 3. *ChemMedChem* **2010,** *5* (4), 513-516.

210. Charrier, J.-D.; Miller, A.; Kay, D. P.; Brenchley, G.; Twin, H. C.; Collier, P. N.; Ramaya, S.; Keily, S. B.; Durrant, S. J.; Knegtel, R. M. A.; Tanner, A. J.; Brown, K.; Curnock, A. P.; Jimenez, J.-M., Discovery and Structure−Activity Relationship of 3-Aminopyrid-2-ones as Potent and Selective Interleukin-2 Inducible T-Cell Kinase (Itk) Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2011,** *54* (7), 2341-2350.

211. Trudel, S.; Li, Z. H.; Wei, E.; Wiesmann, M.; Chang, H.; Chen, C.; Reece, D.; Heise, C.; Stewart, A. K., CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood* **2005,** *105* (7), 2941-8.

212. Wall, M. J.; Chen, J.; Meegalla, S.; Ballentine, S. K.; Wilson, K. J.; DesJarlais, R. L.; Schubert, C.; Chaikin, M. A.; Crysler, C.; Petrounia, I. P.; Donatelli, R. R.; Yurkow, E. J.; Boczon, L.; Mazzulla, M.; Player, M. R.; Patch, R. J.; Manthey, C. L.; Molloy, C.; Tomczuk, B.; Illig, C. R., Synthesis and evaluation of novel 3,4,6-substituted 2-quinolones as FMS kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008,** *18* (6), 2097-2102.

213. Mahboobi, S.; Uecker, A.; Sellmer, A.; Cénac, C.; Höcher, H.; Pongratz, H.; Eichhorn, E.; Hufsky, H.; Trümpler, A.; Sicker, M.; Heidel, F.; Fischer, T.; Stocking, C.; Elz, S.; Böhmer, F.-D.; Dove, S., Novel Bis(1H-indol-2-yl)methanones as Potent Inhibitors of FLT3 and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *Journal of medicinal chemistry* **2006,** *49* (11), 3101-3115.

214. Weisberg, E.; Boulton, C.; Kelly, L. M.; Manley, P.; Fabbro, D.; Meyer, T.; Gilliland, D. G.; Griffin, J. D., Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer cell* **2002,** *1* (5), 433-43.

215. Neumann, T. Design, Synthese und Evaluation selektiver Inhibitoren in Modellen der akuten myeloischen Leukämie sowie der Alzheimer Demenz. Dissertation, Technische Universität Darmstadt
2016.

216. Statsuk, A. V.; Maly, D. J.; Seeliger, M. A.; Fabian, M. A.; Biggs, W. H.; Lockhart, D. J.; Zarrinkar, P. P.; Kuriyan, J.; Shokat, K. M., Tuning a Three-Component Reaction For Trapping Kinase Substrate Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2008,** *130* (51), 17568-17574.

217. Mologni, L.; Rostagno, R.; Brussolo, S.; Knowles, P. P.; Kjaer, S.; Murray-Rust, J.; Rosso, E.; Zambon, A.; Scapozza, L.; McDonald, N. Q.; Lucchini, V.; Gambacorti-Passerini, C., Synthesis, structure–activity relationship and crystallographic studies of 3-substituted indolin-2-one RET inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010,** *18* (4), 1482-1496.

218. Goring, S.; Bensinger, D.; Naumann, E. C.; Schmidt, B., Computer-guided design, synthesis, and biological evaluation of quinoxalinebisarylureas as FLT3 inhibitors. *ChemMedChem* **2015,** *10* (3), 511-22.

219. Davis, M. I.; Hunt, J. P.; Herrgard, S.; Ciceri, P.; Wodicka, L. M.; Pallares, G.; Hocker, M.; Treiber, D. K.; Zarrinkar, P. P., Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* **2011,** *29*, 1046.

220. Voss, C. Design, Synthese und toxikologische Evaluation von Proteasominhibitoren und Fluoreszenzsonden. Technische Universität Darmstadt, 2014.

221. Scholz, C. In silico-Design, Synthese und Evaluation von Kinase- und Proteasom-Inhibitoren sowie Fluoreszenzsonden. Technische Universität Darmstadt, 2015.

222. Beck, P.; Lansdell, T. A.; Hewlett, N. M.; Tepe, J. J.; Groll, M., Indolo-phakellins as beta5-specific noncovalent proteasome inhibitors. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2015,** *54* (9), 2830-3.

223. Bensinger, D.; Neumann, T.; Scholz, C.; Voss, C.; Knorr, S.; Kuckelkorn, U.; Hamacher, K.; Kloetzel, P.-M.; Schmidt, B., Elastase-like Activity Is Dominant to Chymotrypsin-like

Activity in 20S Proteasome's β5 Catalytic Subunit. *ACS Chemical Biology* **2016,** *11* (7), 1800-1804.
224. Xin, B. T.; de Bruin, G.; Huber, E. M.; Besse, A.; Florea, B. I.; Filippov, D. V.; van der Marel, G. A.; Kisselev, A. F.; van der Stelt, M.; Driessen, C.; Groll, M.; Overkleeft, H. S., Structure-Based Design of beta5c Selective Inhibitors of Human Constitutive Proteasomes. *Journal of medicinal chemistry* **2016,** *59* (15), 7177-87.
225. Micale, N.; Ettari, R.; Lavecchia, A.; Di Giovanni, C.; Scarbaci, K.; Troiano, V.; Grasso, S.; Novellino, E.; Schirmeister, T.; Zappala, M., Development of peptidomimetic boronates as proteasome inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* **2013,** *64*, 23-34.
226. Busse, A.; Kraus, M.; Na, I.-K.; Rietz, A.; Scheibenbogen, C.; Driessen, C.; Blau, I. W.; Thiel, E.; Keilholz, U., Sensitivity of tumor cells to proteasome inhibitors is associated with expression levels and composition of proteasome subunits. *Cancer* **2008,** *112* (3), 659-670.
227. Rouette, A.; Trofimov, A.; Haberl, D.; Boucher, G.; Lavallée, V.-P.; D'Angelo, G.; Hébert, J.; Sauvageau, G.; Lemieux, S.; Perreault, C., Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and -extrinsic factors in human cancers. *Scientific reports* **2016,** *6*, 34019-34019.
228. Zhang, S.; Shi, Y.; Jin, H.; Liu, Z.; Zhang, L.; Zhang, L., Covalent complexes of proteasome model with peptide aldehyde inhibitors MG132 and MG101: docking and molecular dynamics study. *Journal of molecular modeling* **2009,** *15* (12), 1481-90.
229. Prats, E.; Gómez-Canela, C.; Ben-Lulu, S.; Ziv, T.; Padrós, F.; Tornero, D.; Garcia-Reyero, N.; Tauler, R.; Admon, A.; Raldúa, D., Modelling acrylamide acute neurotoxicity in zebrafish larvae. *Scientific reports* **2017,** *7* (1), 13952-13952.
230. Khan, T. M.; Benaich, N.; Malone, C. F.; Bernardos, R. L.; Russell, A. R.; Downes, G. B.; Barresi, M. J.; Hutson, L. D., Vincristine and bortezomib cause axon outgrowth and behavioral defects in larval zebrafish. *Journal of the Peripheral Nervous System* **2012,** *17* (1), 76-89.
231. Frett, B.; McConnell, N.; Smith, C. C.; Wang, Y.; Shah, N. P.; Li, H. Y., Computer aided drug discovery of highly ligand efficient, low molecular weight imidazopyridine analogs as FLT3 inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* **2015,** *94*, 123-31.
232. Ogorevc, E.; Schiffrer, E. S.; Sosič, I.; Gobec, S., A patent review of immunoproteasome inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2018,** *28* (7), 517-540.

Dennis Bensinger
Frankfurter Landstraße 83
64291 Darmstadt

18. Dezember 2018

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

(Dennis Bensinger)

Dennis Bensinger
Frankfurter Landstraße 83
64291 Darmstadt

18. Dezember 2018

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.

(Dennis Bensinger)

Lebenslauf

DENNIS BENSINGER

Frankfurter Landstr. 83

64291 Darmstadt

Geburtsdatum:	13. März 1988
Nationalität:	Deutsch

Berufserfahrung

06.2014 – 11.2018	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt

Hochschulausbildung

06.2014 – 12.2018	Promotionsstudium, Technische Universität Darmstadt, FB Chemie. Betreuer: Prof. Dr. Boris Schmidt Thema: *Strukturbasierte Entwicklung und pharmakologische Evaluation von kovalent bindenden FLT3- und Proteasom-Inhibitoren.*
04.2012 – 04.2014	Studium der Chemie an der Technischen Universität Darmstadt (M. Sc. Chemie)
09.2011 – 01.2012	Erasmus-Studium an der Ecole Nationale Supérieure de Chemie de Montpellier, Frankreich
10.2008 – 07.2011	Studium der Chemie an der Technischen Universität Darmstadt (B. Sc. Chemie)

Hochschulreife

08.1999 – 05.2008	Gymnasium, Eleonorenschule Darmstadt, Allgemeine Hochschulreife

(Dennis Bensinger)

Darmstadt, den 18. Dezember 2018